

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



Sestřih atypických intronů v *S. cerevisiae*

Splicing of atypical introns in *S. cerevisiae*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Zdeněk Cit

Školitel: doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 27. 8. 2012

Zdeněk Cit

„Budete-li se snažit porozumět celému vesmíru, nepochopíte vůbec nic. Jestliže se pokusíte porozumět sobě, pochopíte celý vesmír.“

Siddhártha Gautama (Buddha)

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. a doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za odborné vedení projektu a užitečné rady při sepisování diplomové práce.

Také bych chtěl poděkovat Mgr. Ondřeji Gahurovi Ph.D. za seznámení s metodami molekulární biologie a za obětavou pomoc v laboratoři, a RNDr. Anně Valentové i všem ostatním členům laboratoře za krásnou pracovní atmosféru, přátelské prostředí a všechny poskytnuté rady.

Speciální poděkování věnuji také svojí rodině (obzvláště mamince) a kamarádům (obzvláště Mgr. Aleně Koukalové, Bc. Lucii Kladivové a Bc. Ivaně Žigové) za úžasnou podporu a obětavou pomoc.

Abstrakt

Sestřih pre-mRNA je životně důležitý proces významný pro genovou expresi všech eukaryotických organismů. Pro správný průběh tohoto velmi složitého a dynamického děje je zapotřebí několik specializovaných RNA a velké množství proteinů, které zastávají nejrozumnější úlohy nejen přímo uvnitř samotného sestřihového komplexu, ale i mimo něj. Jedním z proteinů účastnících se sestřihu pre-mRNA v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* je i Prp45. Jeho lidským homologem je protein SNW1/SKIP, který se mimo sestřihu podílí i na celé řadě dalších funkcí. U proteinu Prp45 byla zatím spolehlivě popsána pouze účast na druhé transesterifikační reakci sestřihu. Objevily se však i informace naznačující jeho možné zapojení do první transesterifikační reakce. Tato práce přináší další poznatky spojující protein Prp45 s prvním sestřihovou reakcí, které byly získány výzkumem buněk nesoucích mutantní alelu *prp45*(1-169). Buňky nesoucí tuto alelu vykazují mimo zhoršeného sestřihu i akumulaci některých pre-mRNA. Tato práce se proto zabývala i možným vlivem proteinu Prp45 na export RNA z jádra do cytoplasmy. Nebylo však objeveno žádné spojení mezi transportem RNA a tímto proteinem.

Klíčová slova

sestřih pre-mRNA; *Saccharomyces cerevisiae*; Prp45; Mer1; Mud2; Prp22; Rrp6; *AMA1*; SNW1/SKIP

Abstract

Pre-mRNA splicing is a vital process of gene expression important for all eukaryotic organisms. For the proper function of this very complex and dynamic event the presence of few specialized RNA and many proteins that hold a variety of tasks is necessary, not only inside the splicing complex itself, but also beyond this complex. The Prp45 is one of the proteins involved in pre-mRNA splicing in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Its human homologue, SNW1/SKIP, is involved in splicing but also in other crucial cell processes. The Prp45 protein was reliably reported only to participate in the second transesterification reaction of splicing. But there are also data suggesting its possible involvement in the first transesterification reaction. This work provides further evidences linking protein Prp45 with the first splicing reaction, obtained by the research of cells carrying the mutant allele *prp45*(1-169). Cells carrying this allele show dropped splicing and accumulation of pre-mRNAs. This thesis therefore also investigated the possible influence of Prp45 protein on the RNA export from the nucleus to the cytoplasm. But no connection between this protein and RNA transport was discovered.

Keywords

pre-mRNA splicing; *Saccharomyces cerevisiae*; Prp45; Mer1; Mud2; Prp22; Rrp6; *AMA1*; SNW1/SKIP

Obsah

Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract.....	5
Keywords.....	5
Obsah.....	6
Seznam použitých zkratk	9
1 Úvod	11
1.1 Cíle diplomové práce	12
2 Literární přehled	13
2.1 Sestřih pre-mRNA	13
2.2 Sestřih pre-mRNA v kvasince <i>S. cerevisiae</i>	19
2.2.1 Meiotický protein Mer1	21
2.2.2 Sestřihový protein Mud2	24
2.2.3 Sestřihový protein Prp45	25
2.2.4 RNáza Rrp6	27
3 Materiál a metody.....	30
3.1 Materiál	30
3.1.1 Seznam použitých organismů	30
3.1.2 Kultivační média	31
3.1.3 Seznam použitých DNA modifikujících enzymů	32
3.1.4 Seznam použitých souprav pro práci s nukleovými kyselinami.....	34
3.1.5 Reakční programy PCR.....	34
3.1.6 Použitý software	34
3.1.7 Seznam použitých velikostních standardů	35

3.1.8 Seznam použitých primerů	36
3.1.9 Seznam použitých plasmidů	36
3.1.10 Popis použitých plasmidových konstruktů	37
3.2 Metody	41
3.2.1 Příprava a výsev glycerolových konzerv <i>S. cerevisiae</i>	41
3.2.2 Kultivace kvasinek a bakterií	41
3.2.3 Transformace <i>S. cerevisiae</i> lithium-acetátovou metodou	42
3.2.4 Transformace <i>E. coli</i> elektroporací	43
3.2.5 Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou	45
3.2.6 Izolace plasmidové DNA pomocí sady NucleoSpin Plasmid	46
3.2.7 Elektroforetická analýza nukleových kyselin v agarózovém gelu	47
3.2.8 Extrakce DNA z agarózového gelu pomocí sady NucleoSpin Extract II	48
3.2.9 Izolace kvasinkové RNA pomocí soupravy MasterPure Yeast Purification Kit	49
3.2.10 Reverzní transkripce pomocí soupravy RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	51
3.2.11 Analýza citlivosti buněk <i>S. cerevisiae</i> k Cu^{2+} iontům	52
3.2.12 Analýza aktivity enzymu β -galaktosidázy	52
3.2.13 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	54
3.2.14 Ligace DNA v roztoku	55
4 Výsledky	56
4.1 Plasmidové konstrukty AMA1-CUP1	56
4.2 Plasmidové konstrukty AMA1-LacZ	61
4.3 Analýza RNA u buněk s konstrukty AMA1-LacZ	72
5 Diskuse	75
5.1 Analýza sestřihu a exportu mutantu <i>prp45</i> (1-169) s využitím konstruktů AMA1-CUP1	75

5.2 Analýza sestřihu a exportu mutanty <i>prp45</i> (1-169) s využitím konstruktů AMA1-LacZ.....	78
5.2.1 Analýza buněk <i>Δrrp6</i> s defektem v jaderném exosomu	80
5.2.2 Analýza buněk <i>prp22-1</i> s defektem ve druhé sestřihové reakci.....	82
5.2.3 Analýza buněk <i>Δmud2</i> s defektem v první sestřihové reakci.....	84
5.3 Analýza RNA fúzního genu <i>AMA1-LacZ</i>	87
6 Závěr.....	90
Seznam bibliografických citací.....	92

Seznam použitých zkratk

5'ss/3'ss	sestřihová místa
ATP	adenozin-5'-trifosfát
BFM	bromfenolová modř
BS	místo větvení
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	komplementární DNA
dATP	2'-deoxyadenozin-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	enzym hydrolyzující DNA
DTT	dithiotreitol
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ExR	exporterový reportér
ExR-AU	mutovaný exporterový reportér
GDP	guanosin-5'-difosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
GTPáza	enzym hydrolyzující GTP na GDP
hnRNP	komplex proteinů a pre-mRNA
KH	druh domény vázající RNA
LB	médium pro pěstování bakterií
LiAc	lithium acetát
mRNA	mediátorová RNA
NMD	cytoplasmatická dráha degradující mRNA
NTC	proteinový komplex asociovaný s proteinem Prp19 důležitý pro oba kroky sestřihu pre-mRNA
NTP	nukleotid-5'-trifosfát
OD	optická denzita
ONP	orto-nitrofenol
ONPG	orto-nitrofenyl- β -galaktosid

PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PPT	polypyrimidinový úsek
pre-mRNA	prekurzor mRNA
RES	komplex podílející se na zadržování pre-mRNA v jádře
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza	enzym hydrolyzující RNA
RRM	druh domény vázající RNA
rRNA	ribosomální RNA
RS	doména bohatá na arginin a serin
S1	druh domény vázající RNA
SAP	alkalická fosfatáza
SD	minimální médium pro pěstování kvasinek
SD-L-U	minimální médium pro pěstování kvasinek postrádající leucin a uracil
SDS	dodecylsulfát sodný
SF3a/SF3b	proteinové komplexy asociované s U2 snRNP
SH2	druh domény vázající specifické fosforylované tyrosinové zbytky
Sm/LSm	všudypřítomné eukaryotické proteiny, které interagují s RNA
snoRNA	málá jadéřková RNA
SNW	doména obsahující absolutně konzervovaný motiv SNWKN (serin-asparagin-tryptofan-lysin-asparagin)
SpR	sestřihový reportér
ssDNA	jednořetězcová DNA
TAE	pufr tris-acetát-EDTA
TE	Tris/EDTA pufr
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA
U snRNA	málá jaderná RNA bohatá na uridin
U snRNP	málý jaderný komplex obsahující proteiny a U snRNA
UV	ultrafialové záření
YPAD	bohaté médium pro pěstování kvasinek
ŽA	živný agar

1 Úvod

Sestřih pre-mRNA a vznik maturované mRNA je jedním z klíčových procesů ovlivňujících genovou expresi buněk eukaryotických organismů. Jedná se o velmi konzervovaný proces, který probíhá prakticky u všech eukaryot na podobném principu. Současné poznatky vysvětlují základní biochemické principy sestřihových reakcí, popisují propojení sestřihu s transkripcí i s exportem mRNA z jádra a poskytují poměrně dobré informace o složení multimolekulárních komplexů, jež zprostředkovávají jednotlivé sestřihové reakce. Stále ale existuje značné množství nezodpovězených otázek, které nabízejí široký prostor pro výzkum tohoto důležitého děje.

Jedním z modelových organismů dobře využitelných ke studiu sestřihu je i kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (dále jen *S. cerevisiae*). Tento jednobuněčný eukaryot má množství vlastností, které jej činí atraktivním v oblasti výzkumu – rychle se množí, snadno se kultivuje, je dobře geneticky prozkoumaný a existuje celá řada kmenů, ověřených metod, nástrojů a přístupů, které značně usnadňují práci s tímto organismem. Navíc se potvrzuje, že zákonitosti získané studiem sestřihu na této kvasince platí i u evolučně vzdálených organismů.

V laboratoři docenta Petra Folka a docenta Františka Půty se zabýváme (mimo jiné) studiem proteinu Prp45, který je nezbytný pro sestřih pre-mRNA v kvasince *S. cerevisiae*. Podrobným prozkoumáním jeho molekulární funkce bychom chtěli přispět k dalšímu objasnění tohoto složitého procesu z hlediska úlohy jednotlivých složek sestřihového komplexu. K tomuto účelu využíváme kmen *S. cerevisiae* nesoucí mutovanou variantu genu *PRP45* označovanou jako *prp45(1-169)*, která je popsána níže (kapitola 2.2.3).

V rámci svého projektu jsem zkoumal sestřih meiotického genu *AMAI* v kmenech *S. cerevisiae* nesoucích alelu *PRP45* nebo alelu *prp45(1-169)* pomocí sady plasmidových konstruktů získaných ve spolupráci s laboratoří Marca Spingoly (univerzita v Missouri - St. Louis). Plasmidy monitorovaly sestřih a následný export v nich obsaženého fragmentu genu *AMAI* prostřednictvím produkce markerového proteinu Cup1, nebo pomocí markerového proteinu LacZ.

1.1 Cíle diplomové práce

- popsat defekty v sestřihu pre-mRNA genu *AMA1* u mutanty *prp45*(1-169) ve srovnání s buňkami nesoucími alelu *PRP45* pomocí skupiny plasmidů produkujících markerový protein Cup1 nebo LacZ
- zkoumat možnou úlohu proteinu Prp45 v exportu RNA do cytoplasmy
- porovnat defekty zjištěné u mutanty *prp45*(1-169) s defekty dalších mutantních kmenů *S. cerevisiae* ($\Delta mud2$, $\Delta rrp6$, *prp22-1*)
- ověřit získané výsledky prostřednictvím analýzy buněčné RNA

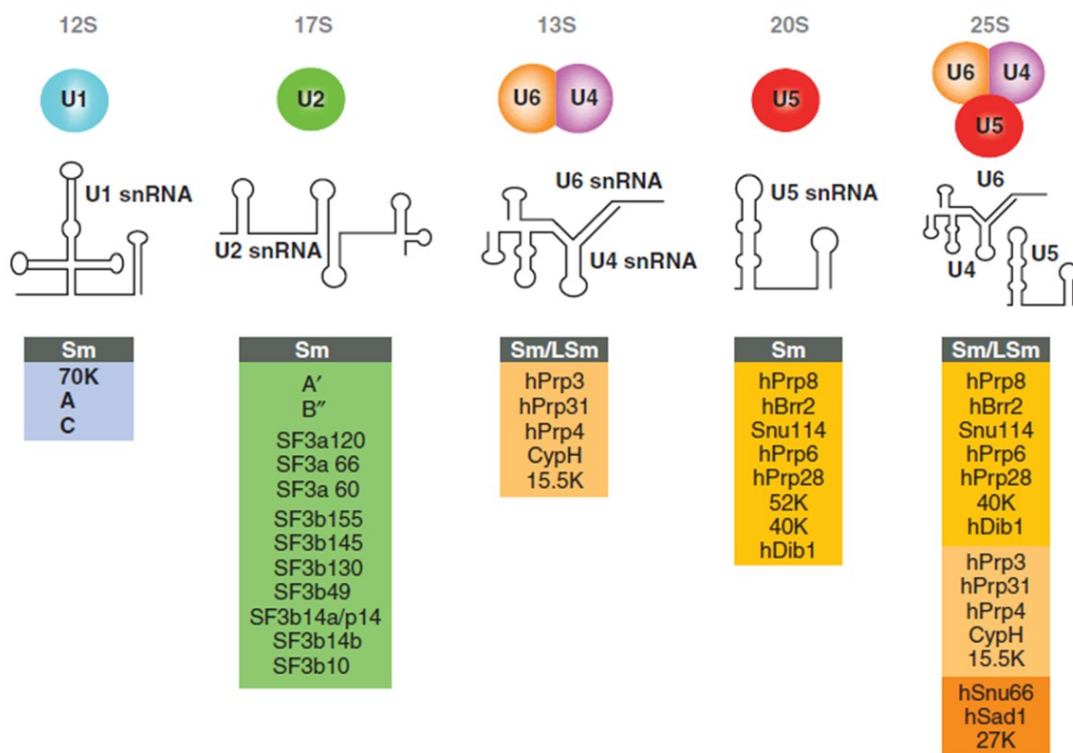
2 Literární přehled

2.1 Sestřih pre-mRNA

Eukaryotické geny jsou ve většině případů transkribovány ve formě pre-mRNA (prekurzor mRNA). Samotná mRNA (mediátorová RNA) potom vzniká z této pre-mRNA procesem zvaným "sestřih". Během sestřihu dochází k odstraňování tzv. intronů, což je typ protein-nekódujících sekvencí, které se nacházejí uvnitř genů, a ke spojování tzv. exonů, což jsou protein-kódující sekvence. Některé pre-mRNA jsou sestřihovány stále stejným způsobem a produkují jeden typ mRNA, takový druh sestřihu se označuje jako "konstitutivní sestřih". Jiné pre-mRNA mohou být sestřihovány několika způsoby a produkovat více typů mRNA, takový druh sestřihu se označuje jako "alternativní sestřih". Alternativní sestřih se vyskytuje především u vyšších eukaryot a zvyšuje komplexitu těchto organismů (Nilsen a Graveley, 2010).

Sestřih pre-mRNA probíhá v jádře a je katalyzován velkým ribonukleoproteinovým komplexem, tzv. "spliceosomem". U většiny eukaryot lze nalézt dva typy sestřihových komplexů: běžný U2 spliceosom, který katalyzuje sestřih klasických typů intronů, a vzácnější U12 spliceosom, který katalyzuje sestřih řídce se vyskytujících typů intronů (Patel a Steitz, 2003). V této práci se zabývám sestřihem majoritního U2 typu intronů.

Spliceosom je velmi dynamický komplex. Na rozdíl od ribosomu, který je v cytoplasmě už předem připraven (jako velká a malá podjednotka) a svou práci začíná s příchodem substrátu, spliceosom je v jádře dynamicky sestavován až na samotné pre-mRNA. Hlavními komponentami spliceosomu jsou malé, jaderné, na uridin bohaté RNA (U snRNA, z anglického small nuclear RNA), které jsou asociovány s proteiny a společně s nimi vytváří ribonukleoproteinové komplexy (U snRNP, z anglického small nuclear ribonnucleoprotein). Běžný spliceosom typu U2 potřebuje ke svému vzniku a správné funkci pět základních U snRNP: U1 snRNP, U2 snRNP, U4 snRNP, U5 snRNP a U6 snRNP. Každá U snRNP se skládá z U snRNA, společných Sm proteinů (B/B', D3, D2, D1, E, F, G) a řady specifických proteinů (Obr. 2.1). U6 snRNP neobsahuje Sm proteiny, ale LSm proteiny (z anglického like Sm). Mimo U snRNP komplexů se však na sestřihu podílí také množství non-snRNP proteinů (Mesa et al., 2008).



Obr. 2.1: Schématické znázornění jednotlivých U snRNP (barevné kruhy) a U snRNA (pod nimi). Nad schémata jsou uvedeny sedimentační koeficienty daných komplexů a pod schémata jsou uvedeny proteiny zastoupené v daných komplexech. Převzato z Will a Lührmann, 2011.

Prvním úkolem sestřihového komplexu je rozpoznat intron. Ten je označen pomocí typických konzervovaných sekvencí v 5' sestřihovém místě (5'ss, z anglického 5' splice site), 3' sestřihovém místě (3'ss, z anglického 3' splice site) a v místě větvení (BS, z anglického branch site). BS se obvykle nachází 18-40 nukleotidů před 3'ss a u vyšších eukaryot jej následuje polypyrimidinový úsek (PPT, z anglického poly-pyrimidine tract) (Grainger a Beggs, 2005).

Během formování spliceosomu dochází k tvorbě RNA-RNA interakcí, a tyto interakce jsou značně pozměňovány v průběhu sestřihu (Sperling et al., 2008). Zatímco sekundární interakce mezi RNA ve spliceosomu jsou povětšinou dobře popsány, informace o povaze a dynamice terciárních interakcí jsou omezené (Nilsen, 1994). Je tedy možné, že konformační změny v rámci spliceosomální RNA sítě jsou ještě komplexnější, než naznačují současné modely (Will a Lührmann, 2011). Postupné změny RNA-RNA a RNA-protein interakcí jsou řízeny především členy DExD/H-box rodiny, mezi něž v kvasinkách patří např. proteiny Prp5, Sub2, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 nebo Prp43 (Staley a Guthrie, 1998). Tyto enzymy využívají energii

hydrolyzy ATP a způsobují strukturní změny spliceosomu. Konkrétní substráty těchto proteinů však nejsou často známy a v některých případech není objasněn ani mechanismus jejich působení. Je ale jisté, že činnost těchto enzymů musí být vysoce koordinována, aby bylo dosaženo velké přesnosti sestřihu (Smith a Konarska, 2008).

V rámci sestavování sestřihového komplexu dochází nejprve k vazbě U1 snRNA na 5'ss, SF1/BBP se váže na BS a heterodimer U2AF se váže k PPT svou 65 kDa podjednotkou (U2AF65) a k 3'ss svou 35 kDa podjednotkou (U2AF35). U2AF (z anglického U2 auxiliary factor) a SF1/BBP (z anglického splicing factor/branch point binding protein) jsou proteiny, které se podílí na identifikaci 3'ss a umožňují pozdější vznik interakce mezi U2 snRNA a BS (Valcarcel et al., 1996; Zuo a Maniatis, 1996). Celý tento proces se děje bez spotřeby ATP a výsledkem je komplex E. Následně dochází k párování mezi U2 snRNA a BS, SF1/BBP je vytlačen a vzniká komplex A (Will a Lührmann, 2011). Pro vznik tohoto komplexu jsou vyžadovány DEAD-box ATPázy Prp5 (z anglického pre-mRNA processing) a Sub2 (z anglického suppressor of Brr1-1). Prp5 využívá hydrolyzu ATP k remodelaci U2 snRNP, čímž napomáhá vazbě U2 snRNA na BS. Mimo to se Prp5 podílí i na kontrole stability komplexu U2/BS (Xu a Query, 2007). Sub2 zase pravděpodobně usnadňuje asociaci U2 snRNP se spliceosomem tak, že vytlačuje proteiny okupující BS, např. SF1/BBP (Kistler a Guthrie, 2001). Interakce U2 snRNA a BS má za následek vystavení klíčového adenosinu ze sekvence BS, jehož 2'-OH skupina se později stane nukleofilem pro první katalytickou reakci sestřihu (Mathew et al., 2008).

Následně se ke komplexu A připojí U4/U6.U5 tri-snRNP, čímž vzniká komplex B1. Pro stabilní integraci U4/U6.U5 tri-snRNP do spliceosomu je v tomto bodě důležitá aktivita proteinu Prp28 (Mathew et al., 2008). V dalším kroku dojde k destabilizaci U1 a U4 snRNP a k aktivaci spliceosomu (vzniká komplex B2), který obsahuje pouze U2/U6.U5 tri-snRNP. V rámci U4/U6.U5 tri-snRNP existuje rozsáhlé párování mezi U4 a U6 snRNA. V tomto kroku jsou však tyto interakce rozrušeny a 5' konec U6 snRNA páruje s 5'ss, čímž nahradí U1 snRNA. Navíc dojde ke spárování U2 a U6 snRNA, což má za následek přiblížení 5'ss a BS potřebné pro první sestřihovou reakci. V rámci U6 snRNA také vzniká vnitřní smyčka, která je pravděpodobně důležitá pro katalýzu sestřihu (Will a Lührmann, 2011).

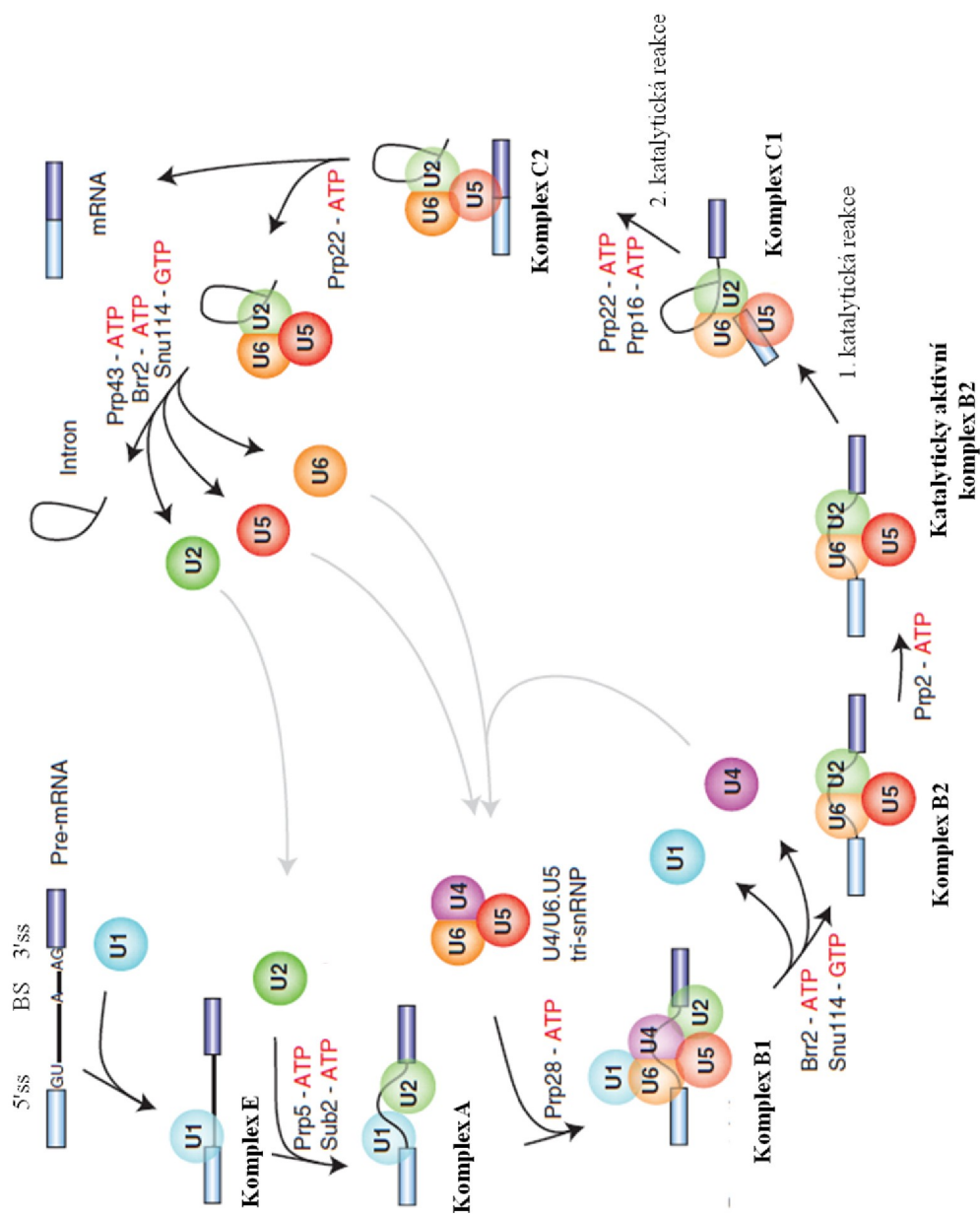
V této fázi je pro porušení párování mezi U4 a U6 snRNA zapotřebí RNA helikáza Brr2 (z anglického *bad response to refrigeration*). Brr2 je stabilní součástí U5 snRNP a je zapotřebí ji důkladně regulovat, aby nedošlo k předčasnému rozpadu interakce mezi U4 a U6 snRNA. K tomuto účelu slouží protein Prp8 společně s GTPázou Snu114 (z anglického *small nuclear ribonucleoprotein associated*). Snu114-GDP blokuje aktivitu helikázy Brr2, zatímco forma Snu114-GTP tento vliv na aktivitu Brr2 nemá (Small et al., 2006). Protein Prp8 zase váže helikázu Brr2 svojí C-koncovou částí a stimuluje její aktivitu. Ke stejné části proteinu Prp8 se váže i GTPáza Snu114, takže by tímto způsobem mohla být koordinována i její funkce. Inkriminovaný úsek Prp8 je také možné ubiquitinylovat a v U4/U6.U5 tri-snRNP k jeho ubiquitinylaci skutečně dochází. Je tedy možné, že tato posttranslační modifikace má klíčovou úlohu ve vzniku komplexu B2 (Bellare et al., 2008).

Komplex B2 je dále katalyticky aktivován RNA helikázou Prp2 a v tomto aktivovaném spliceosomu dojde k první transesterifikační reakci, během níž 2'-OH skupina adenosinu v BS provede nukleofilní útok na první nukleotid v sekvenci 5'ss. V důsledku toho vzniká lasovitý intron-3' exon (lariát) a volný 5' exon. Lasovitý intron je svým 5' koncem napojen na 2' uhlík klíčového adenosinu v sekvenci BS a svým 3' koncem je stále spojen s 3' exonem (lariát-3' exon). První transesterifikační reakce dá tímto vzniknout komplexu C1, který katalyzuje druhou transesterifikační reakci (Will a Lührmann, 2011).

V průběhu druhé transesterifikační reakce provede 3'-OH skupina 5' exonu nukleofilní útok na fosfodiesterovou vazbu spojující 3'ss intronu s 3' exonem a dojde ke spojení (ligaci) obou exonů (Jacquier, 1990). Konformační změny potřebné pro druhou reakci zajišťují především ATPázy Prp16 a Prp22, které slouží také jako časovače, jež rozhodují o dalším osudu substrátu. ATPáza Prp16 funguje na hranici první a druhé transesterifikační reakce. Pokud k hydrolýze jejího ATP dojde ještě před první katalytickou reakcí, potom je substrát (nyní ještě pre-mRNA) následkem změny konformace vyřazen. Pokud je však pre-mRNA zpracována dostatečně rychle a k hydrolýze ATP dojde až po první katalytické reakci, pak je substrát (nyní už lariát-3' exon) následkem změny konformace přijat do dalšího kroku sestřihu (Burgess a Guthrie, 1993a, b).

ATPáza Prp22 působí stejným mechanismem, ale až po první transesterifikační reakci. Pokud k hydrolýze jejího ATP dojde po první katalytické reakci, ale ještě před druhou katalytickou reakcí, substrát (lariát-3' exon) je následkem změny konformace komplexu vyřazen jako neproduktivní. Pokud je však substrát zpracován dostatečně rychle a k hydrolýze ATP dojde až po druhé katalytické reakci, potom následná přestavba komplexu vede k pokračování substrátu do dalšího kroku sestřihu (Query a Konarska, 2006). Po provedení druhé sestřihové reakce se Prp22 dále účastní procesu uvolnění sestřižené mRNA ze spliceosomu, a to pravděpodobně tak, že rozrušuje vazbu mezi U5 snRNP a mRNA (Schwer, 2008).

V poslední fázi sestřihu dojde k uvolnění lasovitého intronu, což je doprovázeno uvolněním U2, U5 a U6 snRNP. Tento proces je katalyzován proteinem Prp43. Mimo něj jsou vyžadovány i proteiny Brr2 a Snu114, které usnadňují rozrušení interakce mezi U2 a U6 snRNA (Small et al., 2006). Lasovitý intron je potom degradován a součásti spliceosomu jsou recyklovány a opět použity při sestavování nového spliceosomu. Celý zde popsany proces (Obr. 2.2) je reverzibilní ve všech krocích (Tseng a Cheng, 2008).



Obr. 2.2: Schématické znázornění vzniku spliceosomu a posloupnosti kroků během sestřihu. Upraveno podle Will a Luhrmann, 2011.

2.2 Sestřih pre-mRNA v kvasince *S. cerevisiae*

Kvasinka *S. cerevisiae* je jednoduchý eukaryot, jehož DNA je dlouhá více než dvanáct tisíc párů bazí (Goffeau et al., 1996). Její genom tvoří šestnáct chromosomů, které obsahují přibližně 5800 funkčních genů (Herrero, 2005), z nichž pouze 5 % (asi 300 genů) obsahuje introny. Těchto 5 % genů je ovšem vysoce transkribováno a vzniká z nich asi 30 % všech mRNA v buňce. Naprostá většina těchto genů (více než 95 %) však obsahuje pouze jediný intron (Nash et al., 2007; Spingola et al., 1999). Takovéto introny jsou pak většinou odstraňovány konstitutivním sestřihem. Základní princip sestřihu pre-mRNA je u kvasinek stejný jako u metazoí, je zde ale samozřejmě i řada dílčích odlišností.

V malém genomu, jakým disponuje právě *S. cerevisiae*, se však nenachází příliš mnoho genů podléhajících alternativnímu sestřihu. První výzkumy, které nepřinesly žádný důkaz o existenci alternativního sestřihu v tomto organismu, to potvrzovaly. Zjistilo se ale, že u několika málo jejích genů dochází k tzv. regulovanému sestřihu, jehož účelem je snižovat genovou expresi (Juneau et al., 2007; Li et al., 1996; Nakagawa a Ogawa, 1999; Parenteau et al., 2008; Preker et al., 2002).

Pokud je během regulovaného sestřihu intron odstraněn, potom vzniká funkční mRNA, která je v cytoplasmě translatována za vzniku funkčního proteinu. Pokud však není intron během regulovaného sestřihu odstraněn, vzniká nefunkční mRNA, v jejíž sekvenci se obvykle nachází předčasný STOP kodón. Takovýto předčasný STOP kodón, obsažený v sekvenci nevystříženého intronu, je potom obvykle rozpoznán cytoplasmatickou dráhou NMD (z anglického nonsense-mediated mRNA decay), díky čemuž dojde k degradaci dané mRNA ještě před tím, než může být translatována (Gonzalez et al., 2001).

Mimo regulovaný sestřih se ale v kvasince *S. cerevisiae* vzácně vyskytuje i normální alternativní sestřih, jehož produktem jsou dva typy funkčních mRNA pocházejících z jedné pre-mRNA. Např. gen *PTC7* produkuje funkční mRNA, ať už je sestřížen nebo nesestřížen. Zatímco jeho sestřížená mRNA produkuje mitochondriální protein, jeho nesestřížená mRNA produkuje membránový protein, který je součástí jaderné membrány (Juneau et al., 2009).

Poměrně malá rozmanitost substrátů pro pre-mRNA sestřih se odráží i ve snížené komplexitě sestřihového komplexu. Kvasinkový spliceosom totiž obsahuje mnohem menší množství proteinů ve srovnání s vyššími eukaryoty. Např. kvasinkový komplex B1 obsahuje asi 60 proteinů (včetně proteinů U1 snRNP, U2 snRNP a U4/U6.U5 tri-snRNP), kdežto lidský komplex B1 obsahuje přibližně 110 proteinů, tedy skoro dvojnásobek. Kvasinkový komplex C obsahuje zhruba 50 proteinů, ale stejný komplex u člověka obsahuje opět asi 110 proteinů (Fabrizio et al., 2009).

Zatím bylo u kvasinky *S. cerevisiae* celkem identifikováno přibližně 90 proteinů účastnících se sestřihu pre-mRNA. A téměř všechny mají své homology ve vyšších eukaryotech (Fabrizio et al., 2009). V případě savčího spliceosomu se však může na sestřihu podílet až 300 proteinů (Rappsilber et al., 2002). Ovšem velká část sestřihových proteinů objevených u člověka a *Drosophila melanogaster*, jejichž homology v kvasinkách nenajdeme, se účastní alternativního sestřihu, který je v *S. cerevisiae* skutečně velmi vzácným jevem (Fabrizio et al., 2009).

Během vzniku a přestavování spliceosomu dochází k dramatickým změnám, které se týkají jak snRNP komplexů, tak non-snRNP proteinů (Wahl et al., 2009). Při přeměně B komplexu na C komplex dochází k výměně stejných homologních proteinů jak u kvasinek, tak u metazoi. Je tedy zřejmé, že tyto změny ve spliceosomu jsou evolučně konzervovanou součástí sestřihového procesu. U kvasinek nastávají nejrozsáhlejší změny při přechodu z katalyticky neaktivního komplexu B1 na katalyticky aktivní komplex B2 (Fabrizio et al., 2009). Během tohoto procesu je ze spliceosomu odstraněno asi 35 proteinů (včetně těch, které jsou součástí U1 snRNP a U4/U6 di-snRNP), zatímco 12 dalších proteinů je ke spliceosomu připojeno. Oproti tomu přechod B2 komplexu na C komplex doprovází změny menšího rozsahu, během nichž se v kvasinkách ze spliceosomu odpojí pouze 2 proteiny a 9 jich je nově připojeno (Wahl et al., 2009).

Kvasinky ani metazoa se mezi sebou příliš neliší ani ve struktuře intronu (Obr. 2.3). Obecně lze říci, že kvasinky mají lépe konzervovanou sekvenci 5'ss a velmi dobře konzervovanou sekvenci BS (Parker et al., 1987). Ovšem oblast označovaná jako PPT je u nich buď velmi redukována, nebo má dosti nejasnou strukturu, případně může i chybět. Nicméně mnoho kvasinkových intronů je obohaceno o uridin v sekvenci předcházející 3'ss (Coolidge et al., 1997).



Obr. 2.3: Schématické znázornění intronu v pre-mRNA se zakreslenými klíčovými sekvencemi. PPT = polypyrimidinový úsek; BS = místo větvení; 5'ss = 5' sestřihové místo; 3'ss = 3' sestřihové místo; R = purin; Y = pyrimidin; N = libovolný nukleotid. Upraveno podle Will a Lührmann, 2011.

2.2.1 Meiotický protein Mer1

Mer1 (z anglického meutotic recombination) je RNA vazebný protein o délce 270 aminokyselin, který je produkován pouze během meiózy (Engbrecht et al., 1991) a s jehož produkcí souvisí zvýšená efektivita sestřihu esenciálních meiotických genů *MER2/REC107*, *MER3/HFM1*, *AMA1/SPO70* (Davis et al., 2000) a *SPO22/ZIP4* (Munding et al., 2010; Qiu et al., 2011). Mer1 se skládá ze dvou domén, a to sice z C-koncové KH domény (z anglického hnRNP K homology domain), která váže RNA, a z N-koncové domény, která interaguje se sestřihovými faktory a podporuje sestřih navázané pre-mRNA (Spingola et al., 2004). KH doména se skládá ze tří antiparalelních β -listů a tří α -helixů a v rámci proteinu Mer1 rozeznává konzervovaný intronový Mer1 element o sekvenci 5'-AYACCCYU-3' (Y = pyrimidin; Spingola a Ares, 2000).

Kromě intronového Mer1 elementu je pro správnou funkci proteinu Mer1 zapotřebí ještě funkční 5'ss, neesenciální protein Nam8 (z anglického nuclear accommodation of mitochondria) a neesenciální protein Snu17. Mer1 vždy kooperuje s proteiny Nam8 a Snu17 při aktivaci sestřihu atypických intronů meiotických genů. Tyto introny, jejichž sestřih je závislý na Mer1, se obvykle vyznačují atypickou 5'ss sekvencí, případně suboptimální BS sekvencí nebo příliš velkým 5' exonem (Qiu et al., 2011; Spingola a Ares, 2000). Např. pokud došlo k experimentálnímu zkrácení 5' exonu genu *MER2/REC107*, nebyl pro jeho efektivní sestřih protein Mer1 již dále potřebný (Nandabalan a Roeder, 1995). Dalo by se tedy říci, že Mer1 kompenzuje slabý sestřihový signál některých pre-mRNA (Spingola et al., 2004).

Jak bylo právě zmíněno, s funkcí proteinu Mer1 souvisí i proteiny Nam8 a Snu17. Nam8 je RNA vazebný protein, jež obsahuje tři RRM domény (z anglického

RNA recognition motif), a který se jako stabilní součást U1 snRNP podílí na interakci s 5'ss. Zajímavé je zjištění, že Nam8 interaguje s pre-mRNA v nekonzervované oblasti následující po 5'ss v blízkosti intronového Mer1 elementu (Zhang a Rosbash, 1999). Oproti tomu Snu17 je součástí proteinového komplexu SF3b, což je stabilní komponenta U2 snRNP (Gottschalk et al., 2001). Ovšem na rozdíl od Mer1, Nam8 ani Snu17 nejsou čistě meiotické proteiny, poněvadž k jejich expresi dochází i během vegetativního růstu buňky. Z výše uvedených informací tedy vyplývá, že schopnost proteinu Mer1 aktivovat sestřih musí zahrnovat jak interakci s proteinovými komponenty U1 snRNP, tak interakci s proteiny U2 snRNP (Spingola et al., 2004).

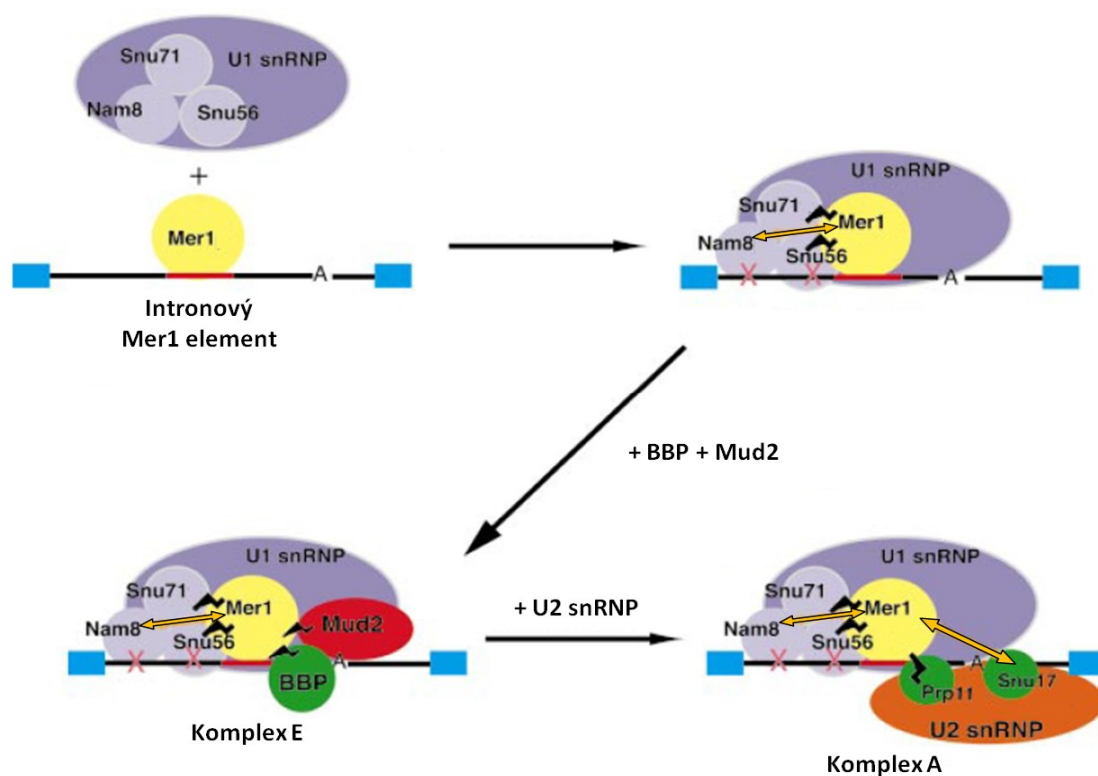
Přestože jsou proteiny Nam8 a Snu17 nezbytné pro Mer1 aktivovaný sestřih, nebyla u nich objevena žádná přímá interakce s proteinem Mer1. Je tedy pravděpodobné, že jejich vzájemná spolupráce je zajištěna přes další prostředníky. V případě proteinu Snu17 je možným kandidátem na takového prostředníka protein Prp11, který je jako součást proteinového komplexu SF3a komponentou U2 snRNP, a u něhož byla potvrzena interakce s proteinem Mer1. Snu71 a Snu56 jsou zase proteiny asociované s U1 snRNP, u nichž byla zjištěna interakce jak s proteinem Nam8, tak s proteinem Mer1 (Spingola et al., 2004). Navíc Balzer a Henry potvrdili esenciální úlohu proteinu Snu56 v Mer1 aktivovaném sestřihu (Balzer a Henry, 2008).

Snu56 je protein nepostradatelný pro růst a přežití buněk, ovšem jeho funkce esenciální pro přežití kvasinky lze oddělit od jeho role v Mer1 aktivovaném sestřihu. Podařilo se totiž vytvořit mutantní alelu *snu56-2*, která umožňuje buňkám přežít, ale znemožňuje Mer1 aktivovaný sestřih. Dosavadní poznatky nasvědčují tomu, že pro Mer1 aktivovaný sestřih je důležitá přítomnost proteinu Snu56 v U1snRNP. Jako součást U1 snRNP interaguje Snu56 s pre-mRNA v blízkosti Nam8 a je možné, že oba proteiny při vazbě na pre-mRNA kooperují. Mimo to Snu56 interaguje i s proteiny Prp11 a Mud2 (Obr. 2.4; Balzer a Henry, 2008).

Snu17 je součástí RES komplexu (z anglického retention and splicing complex), objevila se tedy logická otázka, zda i další komponenty tohoto komplexu neovlivňují Mer1 aktivovaný sestřih. RES komplex je trimerní komplex složený z proteinů Snu17, Bud13 (z anglického bud site selection) a Pml1 (z anglického pre-mRNA leakage), který se podílí na sestřihu a zadržování pre-mRNA v jádře (Dziembowski et al., 2004). Pokusy ukázaly, že ztráta Pml1 má pouze slabý efekt na sestřih genů *MER2/REC107*,

MER3/HFM1 a *AMA1/SPO70*. Ovšem ztráta Bud13 měla výraznější dopad - sestřih genu *AMA1/SPO70* byl znemožněn, sestřih genu *MER2/REC107* byl zhoršen a sestřih genu *MER3/HFM1* ovlivněn nebyl. Z toho vyplývá, že Bud13 pravděpodobně moduluje aktivitu proteinu Mer1 na některých transkriptech (Scherrer a Spingola, 2006).

Na Mer1 aktivovaném sestřihu se různou měrou podílí i řada dalších proteinů. S proteinem Mer1 interagují např. proteiny BBP a Mud2, které napomáhají následnému připojení U2 snRNP (ztráta proteinu Mud2 se projeví zhoršením Mer1 aktivovaného sestřihu, nedojde však k jeho zastavení). I přes všechny dosud získané poznatky však není přesný mechanismus Mer1 aktivovaného sestřihu uspokojivě objasněn (Scherrer a Spingola, 2006).



Obr. 2.4: Model popisující interakce a pravděpodobnou posloupnost dějů v průběhu Mer1 aktivovaného sestřihu meiotických genů. Modré obdélníky znázorňují exony, červená linka představuje intronový Mer1 element, A představuje klíčový adenosin v sekvenci BS a červená X značí vazbu proteinů na pre-mRNA. Přímé interakce s proteinem Mer1 jsou znázorněny pomocí černých blesků (silnější blesk znamená silnější vazbu, slabší blesk znamená slabší vazbu), zatímco oranžové šipky spojují Mer1 s proteiny, které jsou esenciální pro jím aktivovaný sestřih, ale u nichž nebyla objevena žádná přímá interakce s proteinem Mer1. Upraveno podle Spingola et al., 2004.

2.2.2 Sestřihový protein Mud2

Protein Mud2 (z anglického mutant U1 die) je 527 aminokyselin dlouhý protein účastnící se rané fáze sestavování sestřihového komplexu v kvasince *S. cerevisiae*. Jeho savčím homologem je sestřihový faktor U2AF65 (Abovich et al., 1994), který tvoří heterodimer s proteinem U2AF35, váže se k sekvenci PPT v sestřihované pre-mRNA, interaguje s SF1/BBP a je důležitý pro připojení U2 snRNP ke spliceosomu (Ruskin et al., 1988; Selenko et al., 2003).

Mezi proteiny U2AF65 a Mud2 jsou ovšem mnohé strukturní i funkční rozdíly. U2AF65 má na své N-koncové části doménu bohatou na arginin a serin (RS doménu), po níž následují tři RRM domény. Oproti tomu Mud2 obsahuje pouze jedinou RRM doménu v blízkosti C-konce, která je blízce příbuzná poslední RRM doméně (RRM3) proteinu U2AF65 (Abovich et al., 1994). Ta zprostředkovává jak interakci s RNA, tak interakci s kvasinkovým BBP (Selenko et al., 2003). Mud2 také postrádá interakčního partnera obdobného proteinu U2AF35 ani se neváže na PPT (Wang et al., 2008). Místo toho interaguje s BS, což se jeví jako logické, protože oblast PPT není u kvasinek příliš významná, zatímco BS je u nich vysoce konzervovaný (Grainger a Beggs, 2005; Rain a Legrain, 1997).

Mud2 tedy interaguje s komplexem pre-mRNA-U1 snRNP. Tato interakce je závislá na sekvenci v oblasti BS a na interakci s BBP proteinem a umožňuje připojení U2 snRNP ke spliceosomu (Abovich a Rosbash, 1997). Následná vazba U2 snRNP vytlačí BBP i Mud2 z oblasti BS, aby mohlo dojít k vytvoření interakce mezi BS a U2 snRNP (Rutz a Séraphin, 1999). Tyto poznatky naznačují, že Mud2 se účastní rozpoznávání intronu sestřihovým komplexem, ale pravděpodobně nehraje žádnou úlohu při sestřihové reakci samotné (Rain a Legrain, 1997).

Mud2 ani BBP nejsou proteiny nezbytně nutné pro fungování sestřihu pre-mRNA v *S. cerevisiae*. Deletant v genu Mud2 nevykazuje ani žádný růstový fenotyp oproti kontrolním buňkám. Ztráta Mud2 nebo BBP ale způsobí zvýšení množství pre-mRNA v cytoplasmě, což nasvědčuje tomu, že oba proteiny se zřejmě podílí i na zadržování RNA v jádře (Jensen et al., 2003; Rain a Legrain, 1997; Rutz a Séraphin, 1999). Mud2 sice váže BBP *in vitro*, je ale otázkou do jaké míry oba proteiny spolupracují *in vivo* (Wang et al., 2008).

2.2.3 Sestřihový protein Prp45

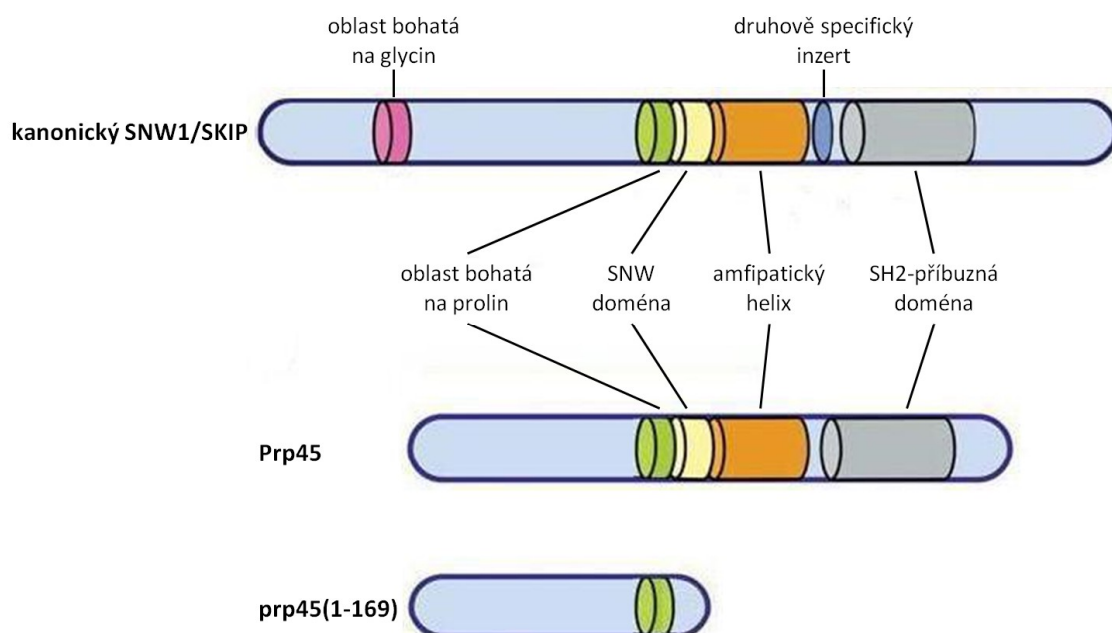
Kvasinkový protein Prp45 je homolog lidského transkripčního koregulátoru SNW1/SKIP (z anglického SNW domain-containing protein/Ski-interacting protein). SNW1/SKIP byl původně identifikován jako vazebný partner onkogenu Ski (Dahl et al., 1998). Následně bylo prokázáno, že se účastní množství signálních drah, jako jsou třeba CBF1/Notch (Zhou et al., 2000), TGFβ/Smad2 (Leong et al., 2001), E2F/pRb (Prathapam et al., 2002) a signální dráhy spjaté s jadernými hormonálními receptory (Zhang et al., 2001). Podílí se však i na celé řadě dalších dějů souvisejících s regulací buněčného cyklu, regulací transkripce nebo s úpravami pre-mRNA, mezi nimiž je také sestřih pre-mRNA (Zhang et al., 2003). Na rozdíl od jeho lidského homologa byla však v případě Prp45 dosud popsána pouze úloha v sestřihu pre-mRNA (Gahura et al., 2009).

Protein SNW1/SKIP je velmi dobře konzervován v mnoha eukaryotických organismech. V genomu se obvykle nachází jen jeden jeho homolog, a ten je v malém množství přítomen ve všech buňkách (Folk et al., 2004). Jeho homology v *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a *Caenorhabditis elegans* jsou nezbytné pro přežití organismu (Folk et al., 1996). Většina těchto proteinů má velmi podobnou strukturu - obsahují oblast bohatou na glycin, oblast bohatou na prolin, SNW doménu (jejíž součástí je absolutně konzervovaný SNWKN motiv), α-helikální doménu a doménu podobnou SH2 doméně (z anglického sarc homology). Výjimkou je právě protein Prp45, který postrádá část N-koncové oblasti obsahující mimo jiné i konzervovaný motiv bohatý na glycin (Obr. 2.5). Také jeho oblast bohatá na prolin je značně redukována a zbytek proteinu se podobá ostatním homologům méně, než se tyto homology podobají sobě navzájem (Folk et al., 2004). Podle Figueroy a Haymana dokáže ale lidský SNW1/SKIP přes všechny tyto rozdíly zajistit přežití buněk *S. cerevisiae* postrádajících protein Prp45. Ovšem takové buňky vykazují sníženou rychlost růstu oproti kontrolním buňkám. To dokazuje, že základní funkce proteinu je zachována ve vyspělých i primitivních eukaryotech i přes jisté sekvenční odlišnosti (Figueroy a Hayman, 2004). Tyto výsledky se však zatím nepodařilo zopakovat.

Prp45 asociuje se sestřihovým komplexem, také asociuje s U2, U5 a U6 snRNP i mimo spliceosom (Albers et al., 2003) a je součástí NTC komplexu (z anglického np nineteen-associated complex), což je proteinový komplex, který se připojuje

k sestřihovému komplexu B během jeho aktivace a poskytuje esenciální sestřihové faktory (Ohi a Gould, 2002).

Esenciální však není celý protein Prp45 o délce 379 aminokyselin, ale pouze jeho N-koncová část. Bylo totiž dokázáno, že k přežití buněk je postačující mutantní varianta proteinu o délce 169 aminokyselin (*prp45(1-169)*; Obr. 2.5). Takové kvasinky však vykazují tvarové defekty, teplotní senzitivitu (přestávají růst při teplotě 37 °C a vyšší), zvýšenou senzitivitu k nokodazolu, inhibitoru polymerace mikrotubulů, a ve zvýšené míře akumulují sestřihové meziprodukty lariát-3' exon. Testováním syntetické letality se zjistilo, že mutanta *prp45(1-169)* geneticky interaguje s alelami sestřihových faktorů druhého katalytického kroku *PRP17*, *PRP18*, *PRP22* a *SLU7* (z anglického synergistic lethal with U5 snRNA) a s alelami komponent NTC komplexu *CEF1* (z anglického *S. cerevisiae* homolog of cdc five), *SYF1* (z anglického synthetic lethal with cdc forty), *CLF1/SYF3* (z anglického crooked neck-like factor) a *NTC20*. Je pravděpodobné, že C-koncová část proteinu Prp45 se nějakým způsobem podílí na připojení Prp22 ke spliceosomu, protože v buňkách *prp45(1-169)* je přítomnost Prp22 v sestřihovém komplexu značně snižena a případná nadprodukce Prp22 vede k částečnému potlačení teplotní senzitivity (Gahura et al., 2009).



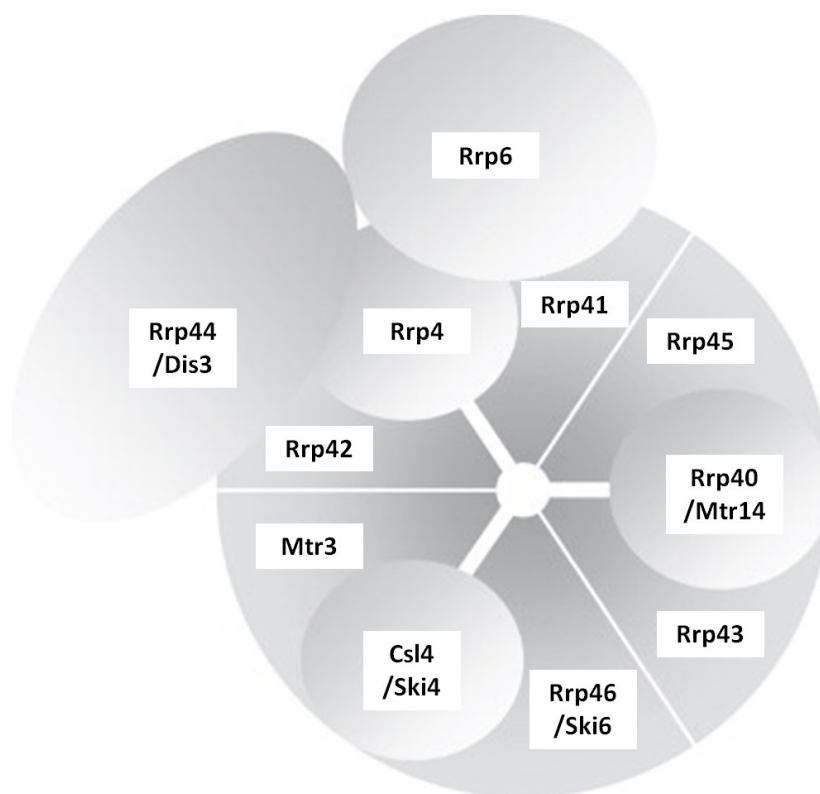
Obr. 2.5: Model znázorňující kanonický protein SNW1/SKIP, jeho vzdálenějšího homologa ze *S. cerevisiae*, esenciální protein Prp45, a mutantní variantu tohoto proteinu, *prp45(1-169)*, která je postačující pro růst a množení buněk *S. cerevisiae*. Upraveno podle Folk et al., 2004.

2.2.4 RNáza Rrp6

Protein Rpp6 (z anglického ribosomal RNA processing) je RNáza s 3'-5' riboexonukleolytickou aktivitou, která je součástí jaderného exosomu (Burkard a Butler, 2000). Exosom je multiproteinový komplex, který se podílí na zpracování a degradaci RNA, a to včetně snRNA, snoRNA (z anglického small nucleolar RNA), tRNA (transferová RNA), rRNA (ribosomální RNA), pre-mRNA a mRNA (Schilders et al., 2005). Lze jej nalézt jak u eukaryot (Mitchell et al., 1997), tak u archeí (Lorentzen et al., 2005), zatímco u bakterií zastává podobnou funkci jednodušší komplex zvaný degradosom (Carpousis, 2002).

Jádro kvasinkového exosomu tvoří šest katalyticky neaktivních proteinů příbuzných RNáze PH (Rrp41/Ski6, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 a Mtr3), které formují hexamerní prstenec. Na vrcholu této struktury jsou umístěny tři proteiny obsahující RNA vazebnou doménu S1 (Rrp4, Rrp40/Mtr14 a Csl4/Ski4), z nichž dva mají i RNA vazebnou doménu KH (Rrp4 a Rrp40/Mtr14). K celému komplexu je dále připojena jedna katalyticky aktivní 3'-5' exoribonukleáza (Rrp44/Dis3) příbuzná RNáze R (Synowsky et al., 2009), která má i endonukleázovou aktivitu (Schneider et al., 2009) a

je odpovědná za katalytickou aktivitu komplexu. V závislosti na lokalizaci exosomu potom dochází k interakci s dalšími proteiny. V případě exosomů lokalizovaných v cytoplasmě s celým výše popsaným komplexem interaguje ještě protein Ski7, zatímco s exosomy lokalizovanými v jádře asociuje ještě katalyticky aktivní protein Rrp6 (Obr. 2.6), který je příbuzný RNáze D (Synowsky et al., 2009).



Obr. 2.6: Schématické znázornění centrálních komponent jaderného exosomu. Základní hexamer tvoří katalyticky neaktivní proteiny Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46/Ski6 a Mtr3, které jsou příbuzné RNáze PH. Na ně nasadají proteiny Rrp4, Rrp40/Mtr14 a Csl4/Ski4, které obsahují RNA vazebné domény. Za katalytickou aktivitu jaderného exosomu jsou odpovědné RNázy Rrp44/Dis3 a Rrp6. Upraveno podle Luz et al., 2007.

U kvasinek nejsou chybně zpracované RNA efektivně exportovány do cytoplasmy, ale dochází k jejich akumulaci v místě transkripce (Custodio et al., 1999; Eberle et al., 2010). Kontrolní mechanismy dokáží rozpoznat alespoň tři druhy defektů zpracování RNA: špatná polyadenylace (Hilleren et al., 2001), chyba při sestřihu intronů (Dziembowski et al., 2004) a defekty v sestavování RNP nebo defekty v asociaci exportních faktorů s RNP (Vinciguerra et al., 2005). Tyto mechanismy působí kotranskripčně a závisí na exosomu a jeho jaderné komponentě, proteinu Rrp6

(Hilleren et al., 2001), které interagují s transkripčním aparátem a s hnRNP proteiny (z anglického heterogenous nuclear ribonuclear particles) asociovanými s RNA (Andrulis et al., 2002). Tato role exosomu je navíc konzervována od kvasinek až po metazoa (Eberle et al., 2010). Protein Rrp6 je také důležitý pro zpracování 3' konce některých rRNA (např. 5,8 rRNA; Briggs et al., 1998), některých snRNA (např. U4 snRNA) a pro zpracování snoRNA (van Hoof et al., 2000).

Ztráta RNázy Rrp6 je slčitelná se životem, ale doprovodnými efekty jsou snižená životaschopnost buněk, teplotní senzitivita (Briggs et al., 1998), akumulace RNA v buňce (LaCava et al., 2005) a vznik netradičních variant některým RNA (van Hoof et al., 2000). V nepřítomnosti Rrp6 vzniká např. prodloužená varianta 5,8 S rRNA, která má 3' konec delší o třicet nukleotidů, jež by byly za účasti Rrp6 degradovány v rámci úprav této RNA (Briggs et al., 1998).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Seznam použitých organismů

Escherichia coli

Kmen **DH5α** - *MI5, recA, gyrA96, thi-1, hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44, relA1, deoR*

Saccharomyces cerevisiae

Kmen **46ΔCUP** - *MATa, ade2, cup1Δ::ura3, his3, leu2, lys2, trp1, ura3, GAL+*

Kmen **MHY04** - *MATa, prp45(1-169)-HA::kanMX6, ade2, cup1Δ::ura3, his3, leu2, lys2, trp1, ura3, GAL+*

Kmen **EGY48** - *MATalfa ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2*

Kmen **EH2** - *MATalfa ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2, prp45(1-169)-HA::kanMX6*

Kmen **BY4741** - *MATa, his3-d1, leu2-d0, met15-d0, ura3-d0*

Kmen **AVY17** - *MATa, prp45(1-169)-HA::NatMX6, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0*

Kmen **Y04923 (Δmud2)** - *MATa, his3D1, leu2D0, met15D0, ura3D0, YKL074c::kanMX4*

Kmen **KGY2847** - *MATa prp22-1, ade2, his3, ura3, leu2*

Kmen **YOR001w (Δrrp6)** - *MATa, his3D1, leu2D0, lys2D0, ura3D0, YOR001w::kanMX4*

Všechny kmeny byly uchovávány v zamraženém stavu při teplotě - 80 °C.

3.1.2 Kultivační média

Kultivace bakteriálních kmenů

Všechna média připravovat z destilované vody a sterilizovat v autoklávu při teplotě 119 °C po dobu 20 min.

1x LB	10 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, Německo)
	5 g/l	Yeast Extract (OXOID, UK)
	5 g/l	NaCl (Penta, ČR)
2x LB (Super LB)	20 g/l	Universalpepton M66 (Merck, Německo)
	10 g/l	Yeast Extract (Oxoid, UK)
	5 g/l	NaCl (Penta, ČR)
	0,1 g/l	Thyamin (Sigma, USA)
ŽA	40 g/l	Živný agar č. 2 (Imuna, SR)

Pro selekční účely lze po klávení přidat do vychlazených médií (cca 50 °C) antibiotika (1000x koncentrované zásobní roztoky):

0,1 g/l	Ampicilin (Biotika, SR)
Zásobní roztok (100g/l) se připraví rozpuštěním jedné dávky prášku do 4 ml deionizované vody a 1 ml 96% ethanolu.	

Kultivace kvasinkových kmenů

YPAD	20 g/l	Universalpepton M66 (Merck, Německo)
	10 g/l	Yeast extract (Formedium, UK)
	0,1 g/l	Adenin-hemisulphate (Sigma, USA)
	[15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid, UK)]

Vše rozpustit v deionizované vodě do 90 % konečného objemu a sterilizovat v autoklávu při teplotě 119 °C po dobu 20 min. Potom přidat 10 % objemu sterilního 20% roztoku glukózy (Sigma, USA) a po vychladnutí (na cca 50 °C) přidat ještě ampicilin (0,1 g/l).

SD médium	6,7 g/l	Yeast nitrogen base without amino acids (Difco; USA)
	1,394 g/l	Synthetic complete amino acid (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium, UK)
	[15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid, UK)]

Vše rozpustit v deionizované vodě do 90 % konečného objemu a sterilizovat v autoklávu při teplotě 119 °C po dobu 20 min. Potom přidat 10 % objemu sterilního 20% roztoku glukózy (Sigma, USA) a po vychladnutí (na cca 50 °C) přidat ještě ampicilin (0,1 g/l, zásobní roztok 1000x koncentrovaný).

V případě potřeby přidat i sterilní roztoky aminokyselin a uracilu (zásobní roztoky 100x koncentrované):

2 g/l	L-Histidin HCl monohydrát (Sigma, USA)
10 g/l	L-Leucin (Sigma, USA)
2 g/l	L-Tryptofan (Sigma, USA)
2 g/l	Uracil (Sigma, USA)

3.1.3 Seznam použitých DNA modifikujících enzymů

Restrikční endonukleázy	<i>Kpn</i> I (MBI Fermentas, Litva): 10 U/μl
	pufr <i>Kpn</i> I: 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,02 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5 při teplotě 37 °C

SacI (New England BioLabs, UK): 10 U/μl

pufr *SacI*: 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl,
10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol,
0,1 mg/ml BSA, pH 7,0 při teplotě 25 °C

EcoRI (MBI Fermentas, Litva): 10 U/μl

SalI (MBI Fermentas, Litva): 10 U/μl

pufr O⁺: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂,
100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5 při
teplotě 37 °C

Ligace plasmidové DNA

T4 DNA ligáza LC (MBI Fermentas, Litva): 1 U/μl

10x ligační pufr (MBI Fermentas, Litva):
400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂,
100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8 při
teplotě 25 °C

Shrimp alkaline phosphatase „SAP“ (MBI
Fermentas, Litva): 1 U/μl

PCR

Taq polymeráza (MBI Fermentas, Litva): 5 U/μl

směs nukleotidů (MBI Fermentas, Litva):
2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM
dCTP, 2,5 mM dTTP

10x reakční pufr s KCl (MBI Fermentas, Litva):
100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl,
0,8 % Nonidet P40, pH 8,8 při teplotě 25 °C

MgCl₂ (MBI Fermentas, Litva): 25 mM

3.1.4 Seznam použitých souprav pro práci s nukleovými kyselinami

Izolace plasmidové DNA	NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL, Německo)
Izolace DNA z agarózového gelu	NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL, Německo)
Izolace RNA	MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, USA)
Reverzní transkripce	RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Litva)

3.1.5 Reakční programy PCR

- 1) 95 °C, 3 min
- 2) 95 °C, 30 s
- 3) 45 °C, 30 s
- 4) 72 °C, 45 s
- 5) kroky 2-4 opakovat celkem 25x
- 6) 72 °C, 2 min
- 7) 10 °C, 30 s

3.1.6 Použitý software

Adobe photoshop (Adobe Systems Inc.) - úprava obrázků

BioEdit 7.1.3 (Tom Hall) - analýza výsledků sekvenací DNA

Clone Manager 9 (Scientific and Educational Software) - navrhování restrikčních štěpení

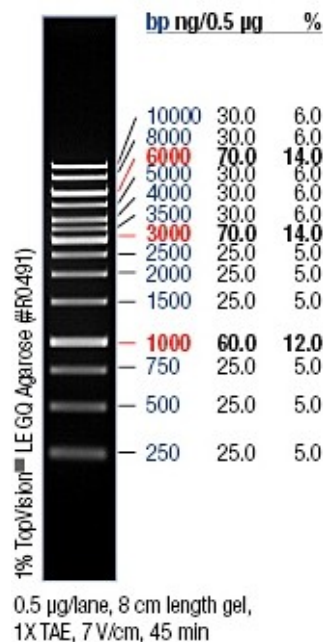
Microsoft Excel (Microsoft Office 2007; Microsoft Corporation) - výpočty rovnic, tvorba tabulek a grafů

ImageQuant TL (Amersham Biosciences Limited) - analýza agarózových gelů

3.1.7 Seznam použitých velikostních standardů

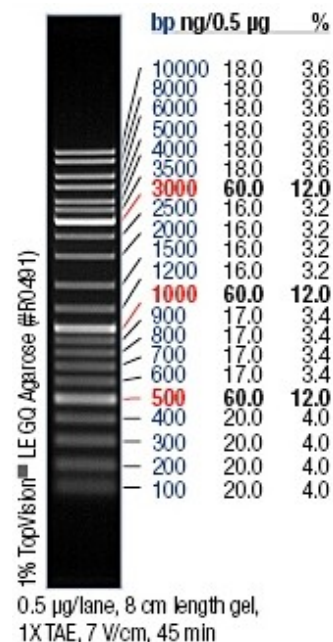
GeneRuler 1 kb DNA Ladder

(MBI Fermentas, Litva)

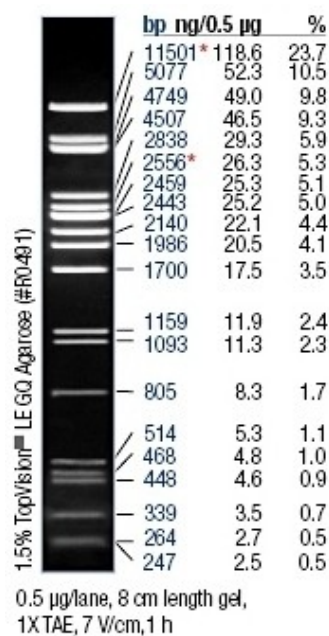


GeneRuler DNA Ladder Mix

(MBI Fermentas, Litva)



Lambda DNA/*Pst*I



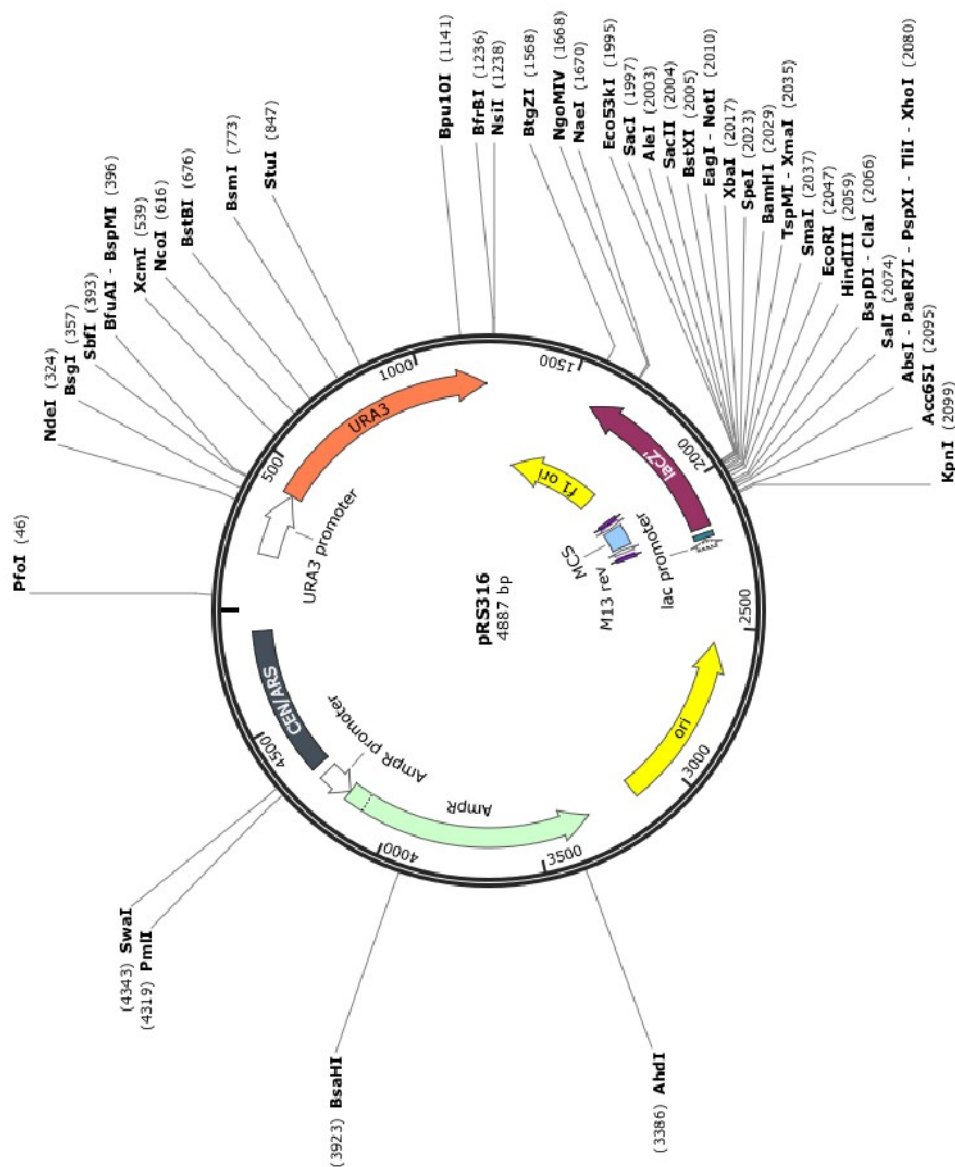
3.1.8 Seznam použitých primerů

OG243 sekvence: CTCTTCGAAATAAAGAGTTTGC
přímý primer pro amplifikaci cDNA AMA1-LacZ

OG244 sekvence: ACGACGTTGTAAAACGAC
zpětný primer pro amplifikaci cDNA AMA1-LacZ

3.1.9 Seznam použitých plasmidů

pRS316



(převzato z http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pRS316/)

3.1.10 Popis použitých plasmidových konstruktů

Sada reportérových plasmidů AMA1-CUP1 byla darem od laboratoře Marca Spingoly (Scherrer a Spingola, 2006). Jednalo se o tři konstrukty, jejichž základem byl plasmid pRS316 (kapitola 3.1.6), do něhož byla vložena sekvence složená ze tří částí v následujícím pořadí: promotor (*TDH3*), fragment genu *AMA1* obsahující intron (oblast genu *AMA1* mezi nukleotidy 900-1320) a reportérový gen *CUP1*. Plasmid sám nesl gen pro resistenci k antibiotiku ampicilinu (*AmpR*) umožňující selekci transformovaných bakteriálních kmenů. Mimo něj nesl i gen pro syntézu uracilu (*URA3*) umožňující selekci transformovaných laboratorních kvasinkových kmenů.

Základní konstrukt AMA1-CUP1 se nazývá sestřihový reportér (SpR, nebo také pRS316AMA1-CUP1). Pokud je tento reportér transformovaný do buněk *S. cerevisiae*, produkuje pre-mRNA fúzního genu *AMA1-CUP1*. Jestliže dojde k sestřihu této pre-mRNA a k následnému transportu mRNA do cytoplasmy, je mRNA translatována a vzniká fúzní protein Ama1-Cup1, který plní funkci markeru podobným způsobem jako samotný protein Cup1. Pokud ale nedojde k vystřihu intronu z pre-mRNA, potom ani v případě, že je tato pre-mRNA transportována do cytoplasmy, nedojde ke vzniku fúzního proteinu Ama1-Cup1. Intron v genu *AMA1* totiž obsahuje předčasný STOP kodon (UAG), který ukončí translaci před přepisem části pro protein Cup1 (Obr. 3.1).

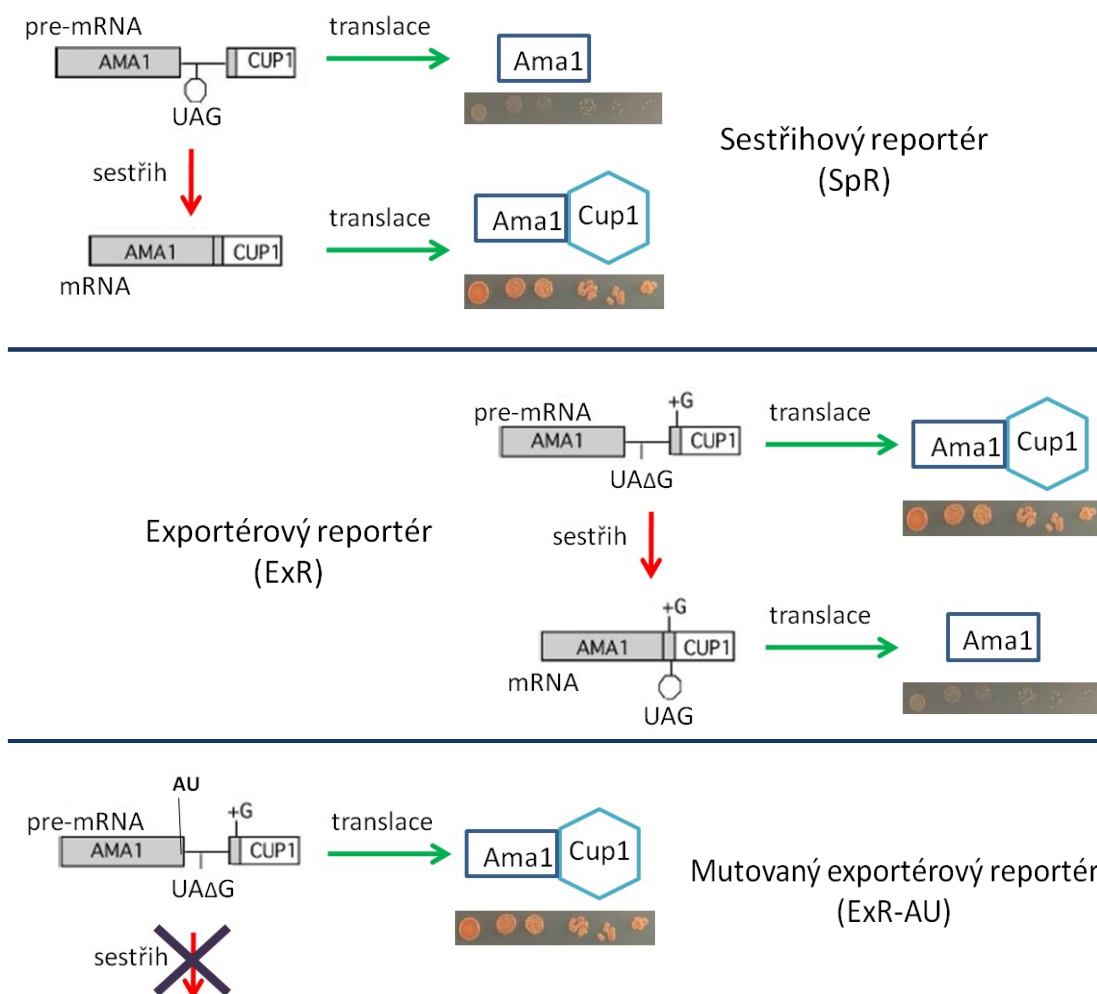
U většiny genů by pre-mRNA s předčasným STOP kodonem byla v cytoplasmě rychle degradována prostřednictvím dráhy NMD (kapitola 2.2). Pre-mRNA genu *AMA1* ani pre-mRNA fúzního genu *AMA1-CUP1* však není ovlivňována touto degradační dráhou. Možným vysvětlením je skutečnost, že aktivace dráhy NMD závisí na pozici předčasného STOP kodonu. *AMA1* i *AMA1-CUP1* jej totiž mají umístěný až ve druhé polovině kódující sekvence, takže většina pre-mRNA je přeložena ještě před dosažením tohoto STOP kodonu. Další možné vysvětlení se opírá o fakt, že aktivace dráhy NMD je závislá na přítomnosti specifické sekvence následující po STOP kodonu, a v případě genu *AMA1* by tato sekvence mohla poskytovat pouze slabý signál (Scherrer a Spingola, 2006).

Marker Cup1 je kvasinkový protein schopný vázat ionty některých těžkých kovů, zvláště potom ionty mědi (Cu^{2+}), a eliminovat tak jejich toxické účinky. Díky tomuto proteinu dokáží kvasinky přežívat i na médiu s vysokou koncentrací měďnatých iontů. *S. cerevisiae* ale ve svém genomu běžně obsahuje více než jednu kopii genu

CUP1 (obvyklé jsou dvě kopie *CUP1-1* a *CUP1-2*), takže pro pokusy s konstrukty AMA1-CUP1 bylo nutné použít kmeny s deletovaným genem *CUP1* (46Δ*CUP* a MHY04).

Druhý konstrukt AMA1-CUP1 se nazývá exportérový reportér (ExR, nebo také pRS316CF7B). Jedná se o variantu sestřihového reportéru, která obsahuje jednonukleotidovou delecí v předčasném STOP kodonu a jednonukleotidovou inzerci v sekvenci následující hned za intronem v genu *AMA1*. Jestliže je tedy pre-mRNA konstruktu sestřižena, transportována do cytoplasmy a translatována, potom je vlivem inserce nukleotidu změněn čtecí rámec, v důsledku čehož navíc vzniká nový předčasný STOP kodon a přepisu proteinu Cup1 je zabráněno. Naopak pokud pre-mRNA není sestřižena a je translatována, dojde ke vzniku fúzního proteinu Ama1-Cup1. Předčasný STOP kodon v intronu je totiž nefunkční a inserce nukleotidu v sekvenci za intronem je kompenzována právě delecí nukleotidu ve STOP kodonu, takže čtecí rámec zůstane nezměněn a translace není předčasně zastavena (Obr. 3.1).

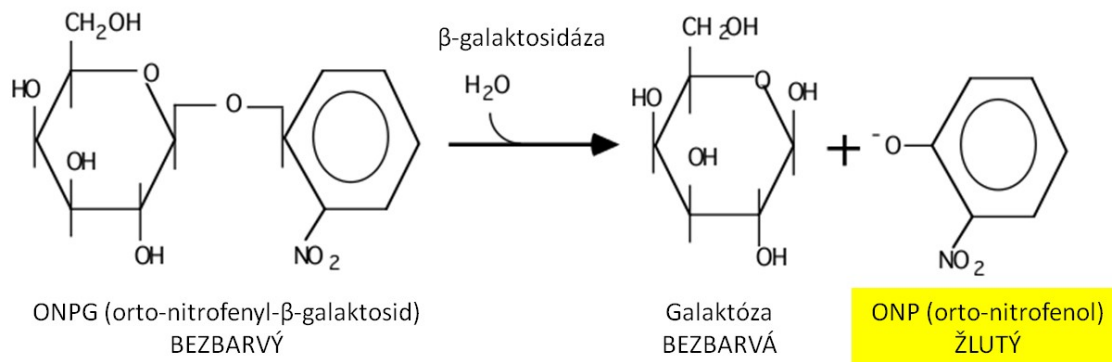
Poslední konstrukt AMA1-CUP1 se nazývá mutovaný exportérový reportér (ExR-AU, nebo také pRS316CF7B-G1A). Je to exportérový reportér s jednonukleotidovou záměnou, která má za následek změnu sekvence 5'ss z GU na AU. Takto mutovaný intron není rozpoznáván sestřihovým aparátem, pre-mRNA tohoto reportéru tedy není sestřihována a po transportu do cytoplasmy je translatována za vzniku fúzního proteinu Ama1-Cup1 (Obr. 3.1). Vznik markerového proteinu v tomto případě tedy nezávisí na sestřihu intronu, ale pouze na exportu pre-mRNA z jádra do cytoplasmy.



Obr. 3.1: Schématické znázornění funkce plasmidových konstruktů AMA1-CUP1. Sestřihový reportér (SpR) produkuje markerový protein Cup1 pouze, pokud je pre-mRNA fúzního genu *AMA1-CUP1* úspěšně sestřižena. To se projeví schopností buněk růst na médiu se zvýšenou koncentrací iontů Cu^{2+} . Pokud pre-mRNA sestřižena není, buňky na médiu s Cu^{2+} nerostou (schopnost buněk růst na médiu se zvýšenou koncentrací Cu^{2+} je znázorněna symbolem narostlých či nenarostlých kolonií). Oproti tomu exportérový reportér (ExR) produkuje protein Cup1 jedině, když nedojde k sestřihu pre-mRNA fúzního genu *AMA1-CUP1*. Pre-mRNA mutovaného exportérového reportéru (ExR-AU) nemůže být sestřihována a pokud je transportována do cytoplasmy, pak vždy produkuje markerový protein (podrobný popis je uveden v textu). Upraveno podle Scherrer a Spingola, 2006.

Druhá sada reportérových plasmidů (AMA1-LacZ) byla také darem od laboratoře Marca Spingoly (Scherrer a Spingola, 2006). Jednalo se o dva konstrukty, sestřihový reportér AMA1-LacZ (SpR) a exportérový reportér AMA1-LacZ (ExR). Oba tyto konstrukty fungovaly na stejném principu jako sestřihový a exportérový reportér

AMA1-CUP1 (Obr. 3.1) s tím rozdílem, že markerový gen *CUP1* byl nahrazen genem *LacZ*. Gen *LacZ* produkuje enzym β -galaktosidázu, který po přidání vhodného substrátu (ONPG) katalyzuje chemickou reakci, jež má za následek vznik žlutého zbarvení u jinak bezbarvé směsi. Intenzitu tohoto zbarvení lze potom měřit spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm (Obr. 3.2).



Obr. 3.2: Chemická rovnice ilustrující vznik žlutého zbarvení při rozkladu ONPG, jež katalyzuje enzym β -galaktosidáza, markerový protein plasmidových konstruktů AMA1-LacZ. Upraveno podle <http://bio-spring.info/wp/?m=2011&paged=13>.

Poslední částí daru od laboratoře Marca Spingoly byly plasmidy R1070 a R1130 (Scherrer a Spingola, 2006), které původně vznikly v laboratoři prof. Roedera (Engbrecht et al., 1991). Oba tyto plasmidy obsahovaly gen pro resistenci k antibiotiku ampicilinu (*AmpR*) umožňující selekci transformovaných bakteriálních kmenů, a gen pro syntézu leucinu (*LEU2*) umožňující selekci transformovaných laboratorních kvasinkových kmenů. Podstatné ale bylo, že plasmid R1070 nesl meiotický protein Mer1, který je potřebný pro účinný sestřih pre-mRNA kvasinkového genu *AMA1* (kapitola 2.2.1). Zatímco plasmid R1130 byl jeho rodičovský vektor, z něhož vznikl plasmid R1070 vložím sekvence pro gen *MER1*, a v pokusech plnil úlohu kontroly.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava a výsev glycerolových konzerv *S. cerevisiae*

Výchozím materiálem může být jakákoliv suspenze buněk *S. cerevisiae*, včetně suspenze enzymaticky opracovaných kvasinkových spor.

- ke 400 µl kvasinkové suspenze přidat 500 µl sterilního 60% glycerolu (60% v/v; Sigma, USA) a šetrně (ale důkladně) promíchat
- inkubovat 30 min při pokojové teplotě (občas promíchat), potom uschovat v mrazáku při teplotě -80 °C
- při výsevu vytáhnout na krátkou dobu konzervu z mrazáku (aby buňky nerozmrzly), seškrábnout vrchní vrstvu zmrzlých buněk (nejlépe sterilním párátkem) a nanést na připravenou misku s agarem (YPAD či SD médium)

3.2.2 Kultivace kvasinek a bakterií

Kultivace v misce s pevným médiem

- na vhodně zvolené pevné médium v petriho misce (průměr 60 mm nebo 90 mm) nanést buněčnou kulturu pomocí sterilního párátko, mikrobiologické kličky či jiného vhodného sterilního nástroje
- v případě *E. coli* probíhá růst asi 1 den, optimální teplota pro kultivaci je 37 °C
- v případě *S. cerevisiae* probíhá růst přibližně 3-4 dny, optimální teplota pro kultivaci je 30 °C
- po kultivaci skladovat misky s buňkami v lednici při teplotě 10 °C maximálně čtyři týdny, potom je optimální rozmrazit nové buňky

Kultivace v tekutém médiu

- sterilní Erlenmayerovu baňku (obvykle o objemu 100-250 ml) naplnit sterilním kultivačním médiem (optimálně do 10 % celkového objemu baňky)

- pomocí mikrobiologické kličky nebo sterilního párátka přenést buněčnou kulturu napěstovanou na pevném médiu do připravené baňky s tekutým médiem, tu potom třepat patřičnou dobu při dané teplotě a otáčkách 180-200 rpm
- nárůst buněk kontrolovat spektrofotometricky

3.2.3 Transformace *S. cerevisiae* lithium-acetátovou metodou

- jednou kolonií příslušného kmene *S. cerevisiae* zaočkovat 10 ml média (YPAD nebo SD médium) a kultivovat přes noc při teplotě 30 °C a otáčkách 180 rpm až do dosažení stacionární fáze
- změřit OD₆₀₀ (Spekol 20), přeočkovat do 10 ml příslušného média na OD₆₀₀ ~ 0,1 a kultivovat na třepačce při teplotě 30 °C a otáčkách 180 rpm dokud kultura nedosáhne OD₆₀₀ ~ 0,4-0,6 (tj. 1,3-2,5 x 10⁷ buněk na 1 ml kultury)
- na jednu transformaci odebrat do sterilní 15ml centrifugační zkumavky množství kultury, která obsahuje přibližně 10⁸ buněk (asi 5 ml při OD₆₀₀ = 0,5), kulturu centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 5 min, 20 °C)
- supernatant odstranit, sediment promýt 10 ml deionizované vody a znovu centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 5 min, 20 °C)
- supernatant odstranit, sediment rozpustit v 1 ml sterilní deionizované vody, převést do 1,5ml mikrozukavky, centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 1 min, 20 °C) a supernatant odstranit
- připravit transformační mix následujícího složení:

73 µl deionizované vody

36 µl 1 M LiAc (Sigma, USA)

10 µl ssDNA (salmon sperm DNA, 10 mg/ml; Sigma, USA) čerstvě denaturovaná povařením (93 °C, 10 min) a inkubovaná na ledu

1 µl plasmidové DNA rozpuštěné ve vodě (0,1-1 µg)

240 µl 50% PEG 3 500 (50% w/v; Sigma, USA)

Směs důkladně promíchat.

- buněčný sediment rozpustit v transformačním mixu a inkubovat 40-90 min při teplotě 42 °C, v průběhu transformace promíchat směs převrácením zkumavky každých 10-15 min
- buněčnou suspenzi centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 1 min, 20 °C), dokonale odstranit supernatant a sediment rozpustit ve 300 µl deionizované vody
- vysít 50-100 µl suspenze na misky s příslušným pevným médiem a kultivovat 3-4 dny při teplotě 30 °C

3.2.4 Transformace *E. coli* elektroporací

Příprava elektrokompetentních buněk

- jednu kolonii příslušného kmene *E. coli* zaočkovat do 30 ml média (2x LB) a kultivovat přes noc při teplotě 37 °C a otáčkách 180 rpm až do dosažení stacionární fáze
- změřit OD₆₀₀ (Spekol 20), přeočkovat do 400 ml příslušného tekutého média na OD₆₀₀ ~ 0,05 a kultivovat při teplotě 37 °C a otáčkách 180 rpm dokud kultura nedosáhne OD₆₀₀ ~ 0,6 (tj. 1,3 – 2,5 x 10⁷ buněk na 1 ml kultury)
- baňky přenést do ledové lázně a nechat zde ochladit po dobu 10-15 min (všechny další kroky rovněž provádět na ledu)
- kulturu přelít do dvou 250 ml plastových centrifugačních zkumavek (Nalgene, USA) a buňky sadit centrifugací (Janetzki K26, 3 500 rpm, 10 min, 0 °C)
- supernatant odstranit, sediment nejprve rozpustit v 10 ml ledové deionizované vody, poté vodou doplnit na původní objem, znovu centrifugovat (Janetzki K26, 3 500 rpm, 10 min, 0 °C), odstranit supernatant, rozpustit v 10 ml ledové deionizované vody a doplnit na objem 100 ml
- buněčné suspenze převést do čtyř 50 ml centrifugačních zkumavek (BD Falcon, USA), opět centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm, 20 min, 0 °C) a odstranit supernatant

- sedimenty rozpustit v 1-5 ml 10% (w/w) ledového glycerolu a poté glycerolem doplnit na objem 25 ml
- suspenze spojit do dvou centrifugačních zkumavek a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm, 20 min., 0 °C), promytí glycerolem je možné ještě zopakovat
- promyté sedimenty rozpustit ve stejném objemu 10% glycerolu (včetně zbytkového objemu supernatantu), suspenzi rozdělit po 100-200 µl do 1,5ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku
- mikrozkušavky neprodleně zamrazit v tekutém dusíku a dlouhodobě skladovat v mrazáku při teplotě -80 °C

Vlastní transformace plasmidové DNA

- do mikrozkušavky s 0,5-5 µl roztoku plasmidové DNA v deionizované vodě (či TE pufru) nebo s ligační směsí (o obsahu 5 pg - 0,5 µg DNA) přidat 30-50 µl elektrokompetentních buněk (vše chladit na ledu)
- obsah mikrozkušavky převést na dno vychlazené 0,2cm elektroporační kyvety (Bio-Rad, USA), na generátoru pulzu přístroje Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, USA) nastavit hodnoty kapacitance 25 µF, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω a po vložení kyvety do přístroje aplikovat puls (výsledná časová konstanta by měla být v rozmezí 4-5 ms)
- obsah kyvety ihned rozpustit v 1 ml LB média s 0,5% glukózou, převést do skleněné zkumavky a kulturu inkubovat 60 min na třepačce při teplotě 37 °C a otáčkách 180 rpm
- na misky s příslušným pevným médiem obsahujícím vhodné selekční antibiotikum (ampicilin; Biotika, SR) vysít 20 µl a 200 µl kultury a kultivovat přes noc v termostatu při teplotě 37 °C

3.2.5 Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou

- na misku s pevným médiem (ŽA) obsahujícím selekční antibiotikum (ampicilin; Biotika, SR) zaočkovat příslušný kmen *E. coli* nesoucí požadovaný plasmid a kultivovat přes noc v termostatu při teplotě 37 °C
- jednu kolonii zaočkovat do 10-50 ml tekutého média (1x LB nebo 2x LB) se selekčním antibiotikem (ampicilin; Biotika, SR) a kultivovat přes noc při teplotě 37 °C a otáčkách 180 rpm
- kulturu ochladit v ledové lázni (asi 10 min), přelít do 50ml centrifugační zkumavky (BD Falcon, USA), centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 400 rpm, 20 min, 0 °C) a odstranit supernatant
- sediment dokonale rozpustit ve 2 ml roztoku I a ponechat 15 min inkubovat na ledu
- zkumavku vyjmout z ledové lázně, přidat 4 ml roztoku II, promíchat a inkubovat po dobu 5 min (projasnění suspenze)
- zkumavku opět přenést do ledové lázně, přidat 3 ml roztoku III, lehce promíchat a inkubovat 15 min na ledu (vznik bílé sraženiny)
- směs převést do zkumavek pro rotor na centrifugu Jouan MR22i a sraženinu sadit centrifugací (Jouan MR22i, 15 000 rpm, 20 min, 0 °C)
- supernatant převést do polypropylenové centrifugační zkumavky, zjistit objem a dokonale smísit s 0,6 objemu isopropanolu (Lach-Ner, ČR), ihned centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm., 6 min, 20 °C) a dokonale odstranit supernatant
- sediment nechat krátce oschnout, poté rozpustit v 300 µl deionizované vody, převést do mikrozukavky, odměřit objem, dokonale smísit se stejným objemem 10 M LiCl (Lach-Ner, ČR) a inkubovat 60 min při teplotě -20 °C (nebo 20 min při teplotě -80 °C)
- vzniklou sraženinu sadit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 5 min, 20 °C), supernatant převést do nové mikrozukavky, odměřit objem a plasmidovou DNA vysrážet z roztoku jedním objemem 96% ethanolu při teplotě -20 °C nejméně 60 min (nebo při teplotě -80 °C aspoň 20 min)

- sraženinu sadit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 5 min, 20 °C), supernatant slít a sediment 2-3x opláchnout 1 ml 70% ethanolu (pokud se sediment uvolní, krátce centrifugovat) a ponechat vysušit na stole (nebo v termostatu při teplotě 37 °C)
- sediment rozpustit ve 100-200 µl deionizované vody nebo TE pufru (pH 8,0) a skladovat při teplotě -20 °C

Roztoky:

roztok I	25 mM Tris-HCl (Serva, Německo) pH 8,0 10 mM EDTA-NaOH (Bio-Rad, USA) 1% glukóza (Sigma, USA)
roztok II	1% SDS (Bio-Rad, USA) 0,2 M NaOH (Lach-Ner, ČR)
roztok III	3 M octan draselný (Lach-Ner, ČR) 2 M kyselina octová (Lach-Ner, ČR) pH 5,4
10x TE pufr	0,1 mM Tris-HCl (Serva, Německo) 10 mM EDTA (Bio-Rad, USA) pH upravit pomocí HCl na požadovanou hodnotu

3.2.6 Izolace plasmidové DNA pomocí sady NucleoSpin Plasmid

- jednou kolonií *E. coli* nesoucí příslušný plasmid zaočkovat 1-5 ml příslušného tekutého média (1x LB nebo 2x LB) se selekčním antibiotikem (ampicilin; Biotika, SR) a kultivovat přes noc při teplotě 37 °C a otáčkách 180 rpm
- narostlou kulturu převést do centrifugační zkumavky, centrifugovat (11 000 g, 30 s) a odstranit supernatant

- sediment rozpustit ve 250 μ l roztoku A1, přidat 250 μ l roztoku A2, jemně promíchat otáčením mikrozkuhavky (6-8x) a inkubovat při pokojové teplotě nejdéle 5 min
- přidat 300 μ l roztoku A3, jemně promíchat otáčením mikrozkuhavky (6-8x) a centrifugovat (11 000 g, 5 min)
- umístit kolonku NucleoSpin Plasmid do 2ml sběrné mikrozkuhavky, převést supernatant z předchozího kroku na kolonku (ne více než 750 μ l), centrifugovat (11 000 g, 1 min) a odstranit tekutinu ze sběrné mikrozkuhavky
- [pro odstranění buněčných nukleáz je doporučeno nanést na kolonku 500 μ l roztoku AW, opět centrifugovat (11 000 g, 1 min) a odstranit tekutinu ze sběrné mikrozkuhavky]
- na kolonku nanést 600 μ l roztoku A4, znovu centrifugovat (11 000 g, 1 min) a odstranit tekutinu ze sběrné mikrozkuhavky
- ještě jednou centrifugovat (11 000 g, 2 min) pro důkladné vysušení membrány a vyhodit sběrnou mikrozkuhavku
- kolonku umístit do čisté 1,5ml mikrozkuhavky, přidat 50 μ l roztoku AE (lze použít i vodu nebo TE pufr), inkubovat 1 min při pokojové teplotě, centrifugovat (11 000 g, 1 min) a skladovat při teplotě -20 °C

Soupravu lze použít i pro čištění plasmidové DNA např. pro sekvenování. V tomto případě stačí doplnit roztok plasmidu roztokem A1 na výsledný objem 250 μ l a dále pokračovat klasicky podle návodu.

3.2.7 Elektroforetická analýza nukleových kyselin v agarózovém gelu

- pro přípravu agarózového gelu použít LE agarózu (FMC, USA) a rozpustit v 1x TAE pufru tak, aby výsledná koncentrace byla v rozmezí 0,5-2,5 % (w/v)
- agarózu v 1x TAE zvážít a zahřívat v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění, poté doplnit destilovanou vodou do původní hmotnosti

- roztok nalít do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem (tloušťka gelu 3-5 mm) a ponechat ve vodorovné poloze až do ztuhnutí, potom opatrně odstranit hřebínek
- gel vložit do elektroforetické aparatury a zalít 1x TAE pufrem
- příslušné vzorky smíchat s 6x vzorkovým pufrem (BFM) v poměru 1:5 a nanést do jamek v gelu (5-50 µl na jamku)
- elektroforézu provádět při dělicím napětí 3-10 V/cm délky gelu, dokud čelo nedorazí do požadované vzdálenosti od okraje gelu
- gel barvit 10-15 min v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml; Sigma, USA), přebytečný ethidium bromid posléze odmyt v destilované vodě
- nakonec gel přenést na UV transluminátor a snímat digitálním fotoaparátem (Panasonic DMC-FZ7)

Roztoky:

1x TAE 40 mM Tris (Serva, Německo)
 20 mM kyselina octová (Lach-Ner, ČR)
 1 mM Na₂EDTA (Bio-Rad, USA)
 pH upravit na hodnotu 8,5

6x vzorkový pufr 0,06 % Bromfenolová modř
 60 % Glycerol (Sigma, USA)
 60 mM EDTA (Bio-Rad, USA)

3.2.8 Extrakce DNA z agarózového gelu pomocí sady NucleoSpin

Extract II

- čistým skalpelem vyříznout část gelu s požadovaným fragmentem DNA, přenést jej do mikrokumavky a zvážit
- na každých 100 mg gelu přidat 200 µl roztoku NT do mikrokumavky (pokud je gel koncentrovanější než 2%, přidat dvojnásobný objem NT roztoku)

- gel s roztokem NT inkubovat při teplotě 50 °C dokud se agaróza nerozpustí (5-10 min, krátce vortexovat každé 2-3 min)
- umístit kolonku NucleoSpin Extract II do 2ml sběrné mikrozkušavky, převést rozpuštěný vzorek z předchozího kroku na kolonku (ne více než 750 µl), centrifugovat (11 000 g, 1 min) a odstranit tekutinu ze sběrné mikrozkušavky
- na kolonku nanést 600 µl roztoku NT3, znovu centrifugovat (11 000 g, 1 min) a odstranit tekutinu ze sběrné mikrozkušavky
- ještě jednou centrifugovat (11 000 g, 2 min) pro důkladné vysušení membrány a vyhodit sběrnou mikrozkušavku
- kolonku umístit do čisté 1,5ml mikrozkušavky, přidat 15-50 µl roztoku NE (předehřát roztok NE na teplotu 70 °C, pokud jsou DNA fragmenty větší než 5 kb) inkubovat 1 min při pokojové teplotě, centrifugovat (11 000 g, 1 min) a skladovat v mrazáku při teplotě -20 °C

3.2.9 Izolace kvasinkové RNA pomocí soupravy MasterPure Yeast Purification Kit

- rozmrazit připravený buněčný sediment skladovaný při teplotě -80 °C nebo připravit čerstvý sediment (optimálnímu množství buněk pro izolaci odpovídá 1-1,5 ml kultury ve střední logaritmické fázi)
- pro každý vzorek připravit směs 300 µl Extraction Reagent for RNA a 1 µl Proteinase K (50 µg/ µl), tuto směs přidat ke vzorku a důkladně vortexovat
- vzorek inkubovat 10-15 min při teplotě 70 °C a vortexovat každých 5 min
- vzorek inkubovat na ledu 3-5 min, přidat 175 µl MPC Protein Precipitation Reagent (vznik sraženiny) a vortexovat 10 s
- vzorek centrifugovat (>10 000 g, 10 min, 4 °C) a supernatant převést do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- k supernatantu přidat 500 µl vychlazeného izopropanolu a promíchat překlápěním zkumavky (30-40x)

- vysráženou RNA sedit centrifugací (>10 000 g, 10 min, 4 °C) a supernatant obsahující izopropanol důkladně odstranit

Pro odstranění DNA ze vzorku pokračovat následujícím způsobem:

- pro každý vzorek připravit směs o celkovém objemu 200 µl (20 µl 10x DNase Buffer, 175 µl deionizované vody zbavené RNáz a 5 µl RNase-Free DNase I)
 - RNA sediment kompletně rozpustit v připravené směsi (nevortexovat) a inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 10-30 min
 - přidat 200 µl 2x T and C Lysis Solution a vortexovat 5 s
 - přidat 200 µl MPC Protein Precipitation Reagent (vznik sraženiny), vortexovat 10 s a inkubovat na ledu 3-5 min
 - vzorek centrifugovat (>10 000 g, 10 min, 4 °C) a supernatant přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky
 - k supernatantu přidat 500 µl vychlazeného izopropanolu a promíchat překlápěním zkumavky (30-40x)
 - vysráženou RNA sedit centrifugací (>10 000 g, 10 min, 4 °C) a supernatant obsahující izopropanol odstranit
-
- vysráženou RNA 2x opláchnout 500 µl 70% ethanolu (pokud se sediment uvolní, krátce centrifugovat) a důkladně odstranit všechny ethanol
 - sediment rozpustit do 35 µl deionizované vody zbavené RNáz nebo do TE pufru
 - [ke vzorku přidat 1 µl RiboGuard™ RNase Inhibitor]
 - skladovat při teplotě -80 °C

3.2.10 Reverzní transkripce pomocí soupravy RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

- do mikrozkuřavky na ledu připravit 12,5 µl směsi následujícího složení:

Templátová RNA	celková RNA	0,1-5 µg
	nebo poly(A) mRNA	10-500 ng
	nebo genově specifická RNA	0,01 pg – 500 ng
Primer	oligo(dT) ₁₈	0,5 µg (100 pmol)
	nebo náhodné hexanukleotidy	0,2 µg (100 pmol)
	nebo genově specifický primer	12-20 pmol
Voda zbavená RNáz		doplnit na objem 12,5 µl

- pokud templátová RNA obsahuje sekundární struktury nebo je bohatá na GC nukleotidy, potom směs vortexovat, krátce centrifugovat, inkubovat 5 min při teplotě 65 °C, zchladit na ledu, opět krátce centrifugovat a umístit na led

- ke směsi přidat následující složky v uvedeném pořadí:

5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0,5 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid TM M-MuLV Reverse Transcriptase	1 µl
Celkový objem	20 µl

- směs promíchat a krátce centrifugovat
- pokud byly jako primer použity náhodné hexanukleotidy, tak inkubovat 10 min při teplotě 25 °C a potom 60 min při teplotě 42 °C, pokud byl použit oligo(dT)₁₈

nebo genově specifický primer, tak inkubovat pouze 60 min při teplotě 42 °C (v případě RNA sekvencí bohatých na GC nukleotidy lze zvýšit teplotu ze 42 °C až na 45 °C)

- reverzní transkripci ukončit zahřátím směsi na teplotu 70 °C po dobu 10 min
- skladovat při teplotě -20 °C

3.2.11 Analýza citlivosti buněk *S. cerevisiae* k Cu^{2+} iontům

- jednou kolonií kvasinek zaočkovat 10 ml příslušného média (SD-L-U) a inkubovat přes noc při teplotě 30 °C a otáčkách 200 rpm
- změřit OD₆₀₀ (Spekol 20), přeočkovat do 10 ml příslušného média na výslednou OD₆₀₀ ~ 0,1 a nechat růst asi 4 hod do OD₆₀₀ ~ 0,3
- do mikrozkuhavky odebrat takové množství buněk, které odpovídá 1 ml suspenze o OD₆₀₀ = 0,3 a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 20 °C, 5 min)
- odstranit supernatant a sediment resuspendovat v 0,5 ml deionizované vody
- provést šest ředění buněk pětkovou ředící řadou a z každého ze šesti ředění nanést 5 µl osmikanálovou pipetou na vhodné selekční médium (SD-L-U) s příslušnou koncentrací $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
- kultivovat 4-5 dní při teplotě 30 °C a nakonec snímat digitálním fotoaparátem (Panasonic DMC-FZ7)

3.2.12 Analýza aktivity enzymu β -galaktosidázy

- jednou kolonií kvasinek zaočkovat 10 ml příslušného média (SD-L-U) a inkubovat přes noc při teplotě 30 °C a otáčkách 200 rpm
- změřit OD₆₀₀ (Spekol 20), přeočkovat do 10 ml příslušného média na výslednou OD₆₀₀ ~ 0,2 a nechat růst asi 4-5 hod do OD₆₀₀ = 0,5-0,8

- do 15ml centrifugační zkumavky odebrat takové množství buněk, aby ve všech zkumavkách bylo stejné množství buněk (odpovídající 1 ml suspenze o $OD_{600} = 4$)
- směs buněk centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4000 rpm, 20 °C, 3 min), odstranit supernatant a Z-pufrem doplnit do původního objemu
- opět centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4000 rpm, 20 °C, 3 min), odstranit supernatant a Z-pufrem doplnit tak, aby výsledná koncentrace buněk odpovídala $OD_{600} = 4$ (doplnit na objem 1 ml)
- takto připravené buňky vložit na led a přidat 1 μ l merkaptoethanolu na 300 μ l buněčné suspenze (3,4 μ l do každé zkumavky)
- do šroubovací 1,5ml mikrozukumavky umístit 250 μ l skleněných kuliček a 300 μ l buněčné suspenze
- mikrozukumavku vložit do přístroje na drcení buněk (FastPrep-24 Instrument) a provést drcení (rychlost: 6 m/s, počet cyklů: 4, délka cyklu: 15 s, prodleva mezi cykly: 5 min), mezi cykly mikrozukumavku stále chladit na ledu
- k buněčnému lyzátu (stále uchovávanému na ledu) přidat 300 μ l chlazeného Z-pufu a vortexovat
- do čisté 1,5ml mikrozukumavky napipetovat 350 μ l Z-pufu, 250 μ l buněčného lyzátu a 80 μ l roztoku ONPG (4 mg/ml; Sigma, USA; připravovat čerstvě) a směs inkubovat 60 min na třepacím přístroji při teplotě 30 °C
- reakci zastavit přidáním 250 μ l 1 M Na_2CO_3 (Lach-Ner, ČR), vzorky centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 20 °C, 3 min) a změřit OD_{420} na spektrofotometru (UV Mini 1240, Shimadzu), případně i OD_{550} pro korekci

Výpočet:

Millerovy jednotky = $1000 \times [(OD_{420} - 1,75 \times OD_{550})] / (T \times V \times OD_{600})$

OD_{420} a OD_{550} - hodnoty změřené v závěru pokusu

OD_{600} - optická denzita buněčné suspenze po centrifugaci a omytí pufrem

T = délka enzymatické reakce v minutách

V = objem buněčné suspenze použitý pro enzymatickou reakci v mililitrech

Roztoky:

Z-pufr	21,5 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
	6,2 g/l	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
	0,65 g/l	KCl (Penta, ČR)
	0,246 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)

pH upravit na hodnotu 7,0 (pro dlouhodobé uskladnění sterilizovat v autoklávu při teplotě 119 °C po dobu 20 min)

3.2.13 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- v 0,5ml mikrozkušavce připravit následující směs:

10x restrikční pufr	2 µl (10 % výsledného objemu)
[BSA 100 µg/µl	2 µl (10 % výsledného objemu)]
vzorek DNA ve vodě	X µl (0,1-4 µg DNA)
deionizovaná voda	doplnit na objem 20 µl
- v závislosti na struktuře a čistotě vzorku přidat 1-10 U enzymu/µg DNA
- inkubovat 1-4 hod při optimální teplotě štěpení (obvykle 37 °C)
- reakci zastavit přidáním vzorkového pufru, ochlazením směsi na -20 °C, nebo zahřátím na teplotu 65 °C po dobu 20 min
- množství a kvalitu naštěpené DNA zjistit elektroforézou v agarózovém gelu

3.2.14 Ligace DNA v roztoku

- v 0,5ml mikrozkuhavce připravit následující směs:

10x ligační pufr (MBI Fermentas, Litva)	1 μ l (10 % objemu)
DNA vektor a inzert v molárním poměru 1:3 (1:4)	X μ l (0,1-10 mM)
T4 DNA ligáza (MBI Fermentas, Litva)	0,2-0,4 μ l (0,2-0,4 U)
deionizovaná voda	doplnit na objem 10 μ l

- ligační směs inkubovat 1-4 hodiny při laboratorní teplotě (pro vyšší účinnost lze začít ligovat ve vodní lázni o pokojové teplotě, tu potom přemístit do lednice a nechat ligovat přes noc)
- ligázu inaktivovat zahřátím na teplotu 65 °C po dobu 10 min nebo na teplotu 70 °C po dobu 5 min

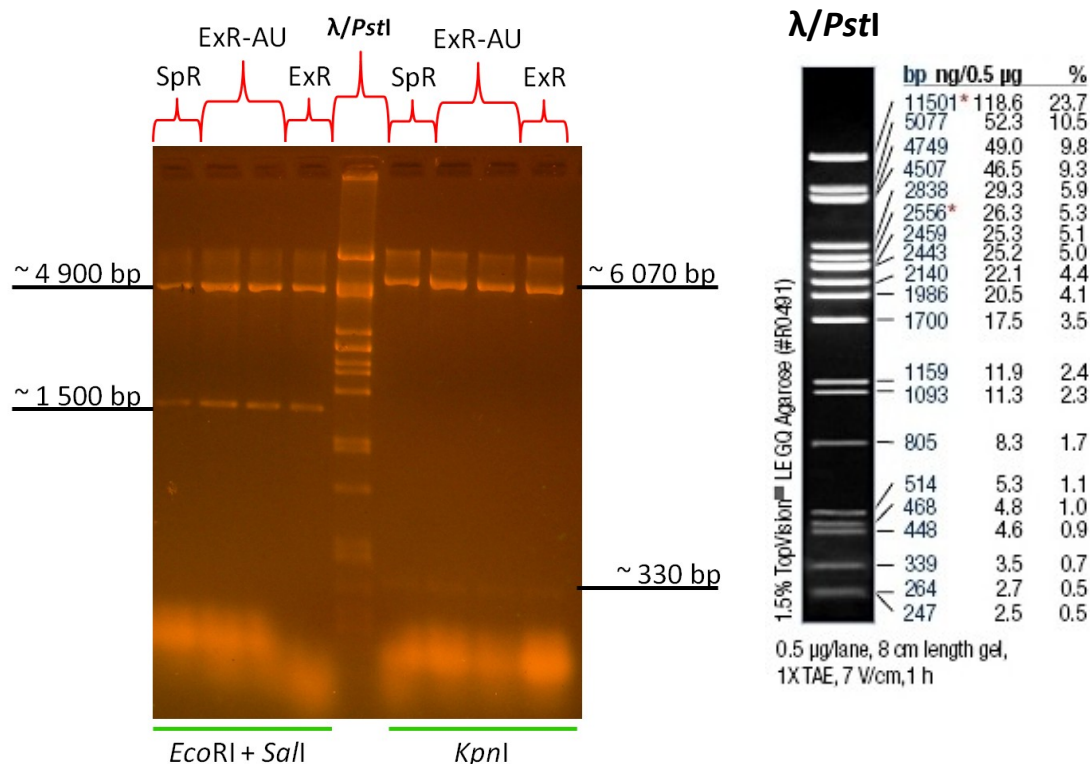
4 Výsledky

4.1 Plasmidové konstrukty AMA1-CUP1

Plasmidové konstrukty AMA1-CUP1 spolu s plasmidy R1070 nebo R1130 byly transformovány do bakterií *E. coli* elektroporací a po kultivaci na selekčním médiu s ampicilinem byly z buněk izolovány alkalickou metodou. Plasmidy AMA1-CUP1 byly potom pro ověření podrobeny restričnímu štěpení dvojicí enzymů *EcoRI* a *SalI* a samostatně ještě enzymem *KpnI*. Inzert promotor-*AMA1-CUP1* byl do plasmidu pRS316 vložen přes restriční místa *EcoRI* a *SalI*, použitím těchto restričních enzymů tedy vznikl fragment odpovídající délce vektoru (~ 4 900 bp) a fragment odpovídající délce inzertu (~ 1 500 bp). Gen *CUP1* byl zase z obou stran ohraničen restričním místem pro *KpnI*, použitím tohoto enzymu tedy vznikl fragment odpovídající délce genu *CUP1* (s přilehlými sekvencemi celkem ~ 330 bp) a fragment odpovídající délce zbylé části plasmidu (~ 6 070 bp). Fragmenty vzniklé během obou štěpících reakcí byly poté elektroforeticky analyzovány v 1,5% agarózovém gelu (Obr. 4.1).

Složení restričních směsí:

	0,5 µl <i>EcoRI</i>	
	0,5 µl <i>SalI</i>	1 µl <i>KpnI</i>
	2 µl pufru O+	2 µl pufru <i>KpnI</i>
	1 µl plasmidu (~ 3 µg/µl)	1 µl plasmidu (~ 3 µg/µl)
	16 µl vody	16 µl vody
Celkem:	20 µl	20 µl



Obr. 4.1: Plasmidové konstrukty AMA1-CUP1 byly štěpeny kombinací restriktáz *EcoRI* a *SalI* (levá část gelu) a restriktázou *KpnI* (pravá část gelu). Fragmenty byly děleny v 1,5% agarózovém gelu za použití pufru 1x TAE při napětí 1 V/cm. Velikostní marker $\lambda/PstI$ představují fragmenty DNA fága lambda (λ) štěpené restriktčním enzymem *PstI* (v obr. značen jako $\lambda/PstI$). SpR = sestřihový reportér AMA1-CUP1, ExR = exportérový reportér AMA1-CUP1, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-CUP1.

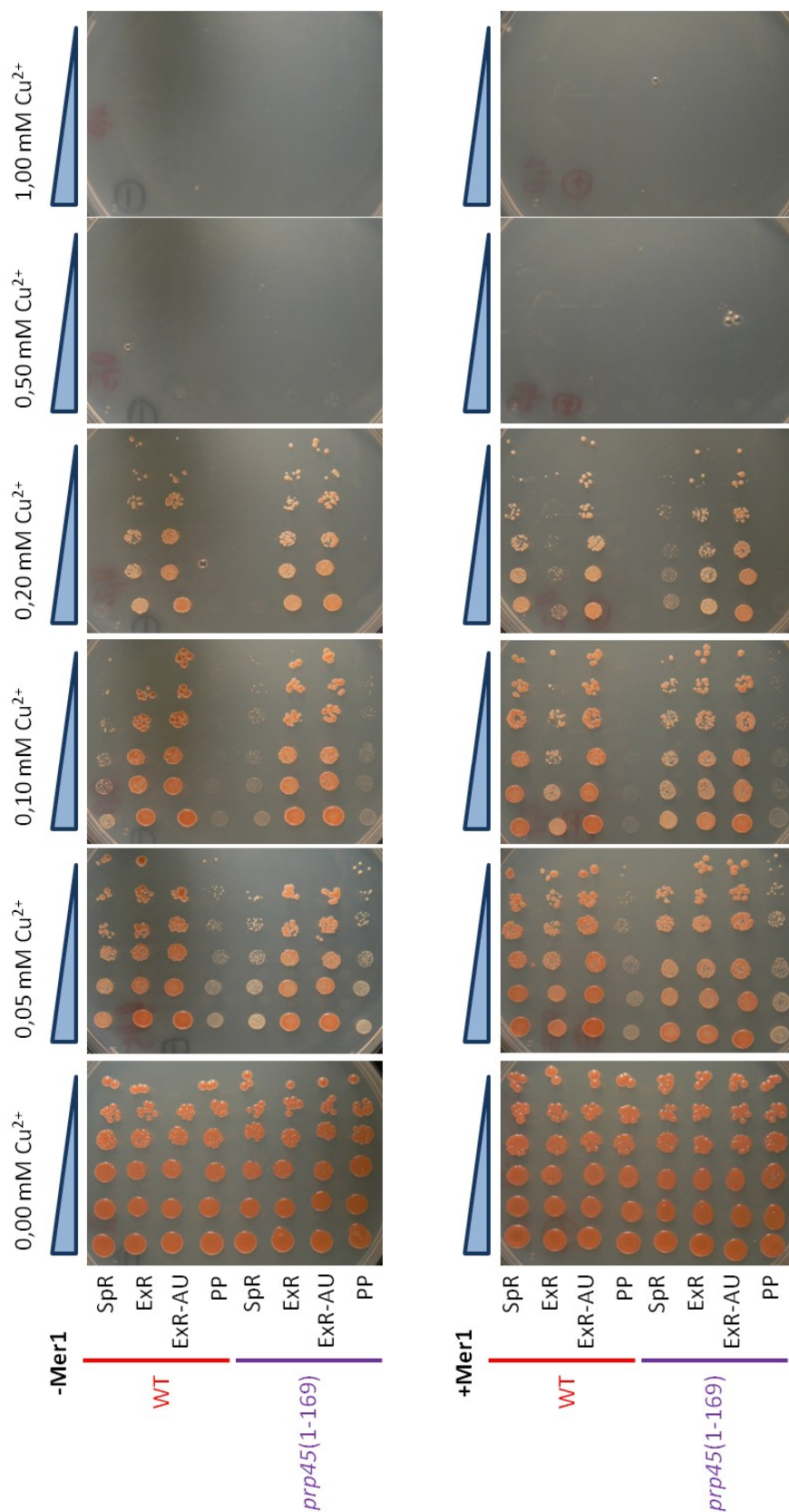
Plasmidové konstrukty AMA1-CUP1 byly odeslány k sekvenování do laboratoře sekvenace DNA Biologické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (dále jen laboratoř sekvenace). K sekvenaci byl použit komerční primer T3 a plasmidy byly pro potřeby sekvenace čištěny sadou NucleoSpin Plasmid. Po úspěšném sekvenování byly tyto plasmidy transformovány lithium-acetátovou metodou do buněk 46ΔCUP (WT; z anglického wild type - zde míněno jako buňky s nemutovanou alelou genu *PRP45*) a MHY04 (*prp45*(1-169)) lithium-acetátovou metodou. Pokaždé byly transformovány dva plasmidy, a to sice jeden konstrukt AMA1-CUP1 (SpR, ExR nebo ExR-AU) či samotný plasmid pRS316 bez inzertu (PP - prázdný plasmid), a jeden plasmid R1070 (+Mer1) nebo R1130 (-Mer1). Buňky byly poté kultivovány na selekčním médiu SD bez leucinu a uracilu (SD-L-U). Aliquot buněk byl uložen při teplotě -80 °C v podobě glycerolových konzerv.

Všechny typy transformovaných buněk byly podrobeny analýze citlivosti k měďnatým iontům testem růstu na médiích s různou koncentrací Cu^{2+} (Obr. 4.2). Podle očekávání by buňky s plasmidem bez genu *CUP1* (PP) měly vždy vykazovat pouze minimální schopnost růstu na médiích s Cu^{2+} , zatímco buňky s mutovaným exportérovým reportérem (ExR-AU) by měly vykazovat nejvyšší odolnost k měďnatým iontům. V obou případech by výsledek neměl záležet na typu druhého plasmidu, a tedy ani na přítomnosti proteinu Mer1. Oproti tomu schopnost růstu buněk se sestřihovým reportérem (SpR) a exportérovým reportérem (ExR) by měla být výrazně ovlivněna přítomností proteinu Mer1, a tedy plasmidy R1070 (+Mer1) nebo R1130 (-Mer1). Sestřihový reportér (SpR) by měl růst o poznání lépe v přítomnosti proteinu Mer1 než bez něj. Exportérový reportér (ExR) by měl naopak lépe růst za nepřítomnosti proteinu Mer1 (kapitola 3.1.10).

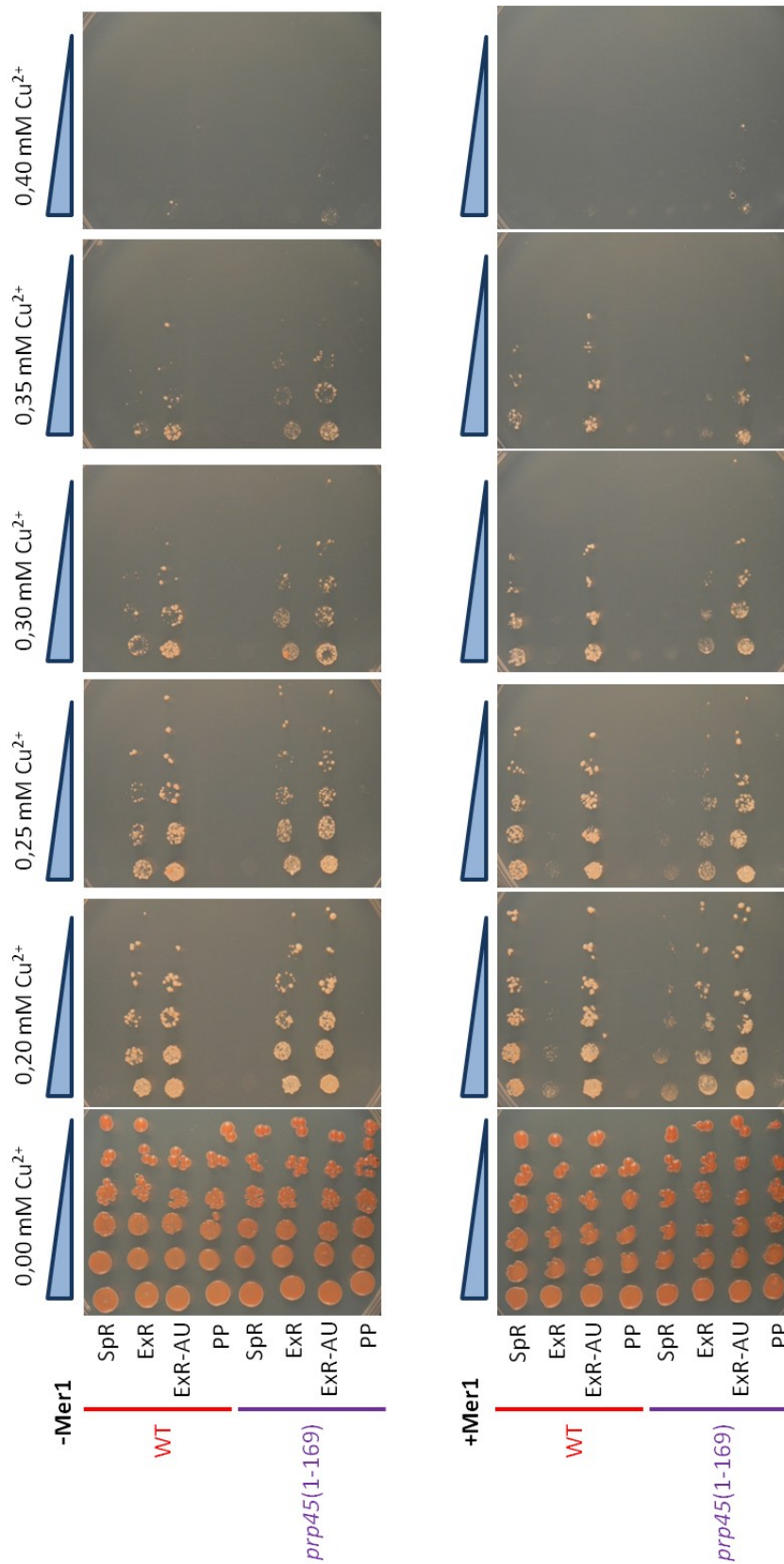
Z výsledků analýzy (Obr. 4.2) bylo patrné, že na médiu bez Cu^{2+} rostly dobře všechny typy buněk bez pozorovatelného rozdílu, zatímco na médiu se zvýšenou koncentrací měďnatých iontů v rozmezí 0,05-0,35 mM byly značné rozdíly, které odpovídaly teoretickým předpokladům. Koncentrace Cu^{2+} iontů vyšší než 0,4 mM byla potom toxická pro všechny typy použitých buněk. Pro porovnání byly na médiu s vysokou koncentrací měďnatých iontů kultivovány i buňky bez plasmidů, ale s přirozenými alelami genů *CUP* v chromosomu (Obr. 4.3). V tomto případě byly použity kmeny EGY48 (WT) a EH2 (*prp45*(1-169)).

Při srovnávání buněk $46\Delta\text{CUP}$ a MHY04 nebyl vidět zřetelný rozdíl, pokud nesly plasmid pRS316 bez inzertu (PP). Tyto buňky v přítomnosti Cu^{2+} iontů prakticky nerostly. Rozdíl mezi kmeny nebyl patrný ani za přítomnosti mutovaného exportérového reportéru (ExR-AU), kdy buňky rostly nejlépe. Slabý růst těchto buněk byl patrný i na médiu s 0,4 mM koncentrací Cu^{2+} (Obr. 4.2).

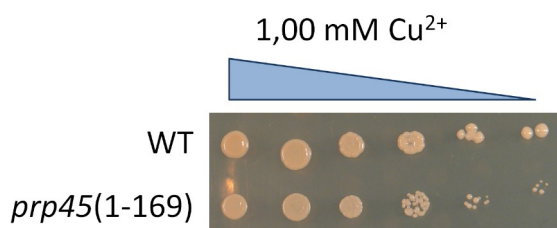
Rozdíl mezi kmeny $46\Delta\text{CUP}$ a MHY04 byl však dobře pozorovatelný v případě exportérového reportéru (ExR) a sestřihového reportéru (SpR). Buňky SpR +Mer1 rostly lépe než buňky SpR -Mer1 a oba tyto typy buněk prosperovaly více v přítomnosti nemutované alely *PRP45* ($46\Delta\text{CUP}$). Oproti tomu buňky ExR +Mer1 rostly hůře než buňky ExR -Mer1 a buňkám ExR +Mer1 se dařilo lépe v přítomnosti alely *prp45*(1-169) (MHY04). U buněk ExR -Mer1 už ale rozdíl související s genem *PRP45* tak zřetelný nebyl (Obr. 4.2).



Obr. 4.2a: Výsledky analýzy citlivosti buněk *S. cerevisiae* k Cu^{2+} iontům. Použity byly kmeny WT = 46 Δ CUP (nese nemutovanou alelu *PRP45*) a *prp45*(1-169) = MHY04 (nese mutovanou alelu *prp45*(1-169)). Každý typ buněk nesl dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-CUP1, ExR = exportérový reportér AMA1-CUP1, PP = plasmid pRS316 bez inzertu, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Buňky byly kapány na médium SD-L-U s různou koncentrací Cu^{2+} iontů a kultivovány po dobu čtyř dnů při teplotě 30 °C. Snižující se koncentrace buněk v různých kapkách je znázorněna modrým trojúhelníkem.



Obr. 4.2b: Výsledky analýzy citlivosti buněk *S. cerevisiae* k Cu^{2+} iontům. Použity byly kmeny WT = 46 Δ CUP (nese nemutovanou alelu *PRP45*) a *prp45*(1-169) = MHY04 (nese mutovanou alelu *prp45*(1-169)). Každý typ buněk nesl dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-CUP1, ExR = exportérový reportér AMA1-CUP1, PP = plasmid pRS316 bez inzertu, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Buňky byly kapány na médium SD-L-U s různou koncentrací Cu^{2+} iontů a kultivovány po dobu čtyř dnů při teplotě 30 °C. Snižující se koncentrace buněk v různých kapkách je znázorněna modrým trojúhelníkem.



Obr. 4.3: Růst buněk *S. cerevisiae* bez deletovaných chromosomálních *CUP* genů na médiu SD-L-U se zvýšenou koncentrací iontů Cu^{2+} . Použité kmeny EGY48 (WT) a EH2 (*prp45(1-169)*) byly kultivovány po dobu čtyř dnů při teplotě 30 °C. Snižující se koncentrace buněk v různých kapkách je znázorněna modrým trojúhelníkem.

4.2 Plasmidové konstrukty AMA1-LacZ

Práce s konstrukty AMA1-CUP1 byla přínosná - pokračovalo se tedy v pokusech s využitím konstruktů AMA1-LacZ. Plasmidy AMA1-LacZ v první řadě nevyžadovaly žádné speciálně upravené buňky jako plasmidy AMA1-CUP1, které potřebovaly kmeny s deletovanými geny *CUP*. Tím se otevřela cesta k použití dalších mutantních kmenů *S. cerevisiae*, které byly k dispozici pouze s geny *CUP* přítomnými na jejich chromosomech. Další výhodou tohoto systému byla možnost číselně kvantifikovat výsledky pro jejich lepší zpracování.

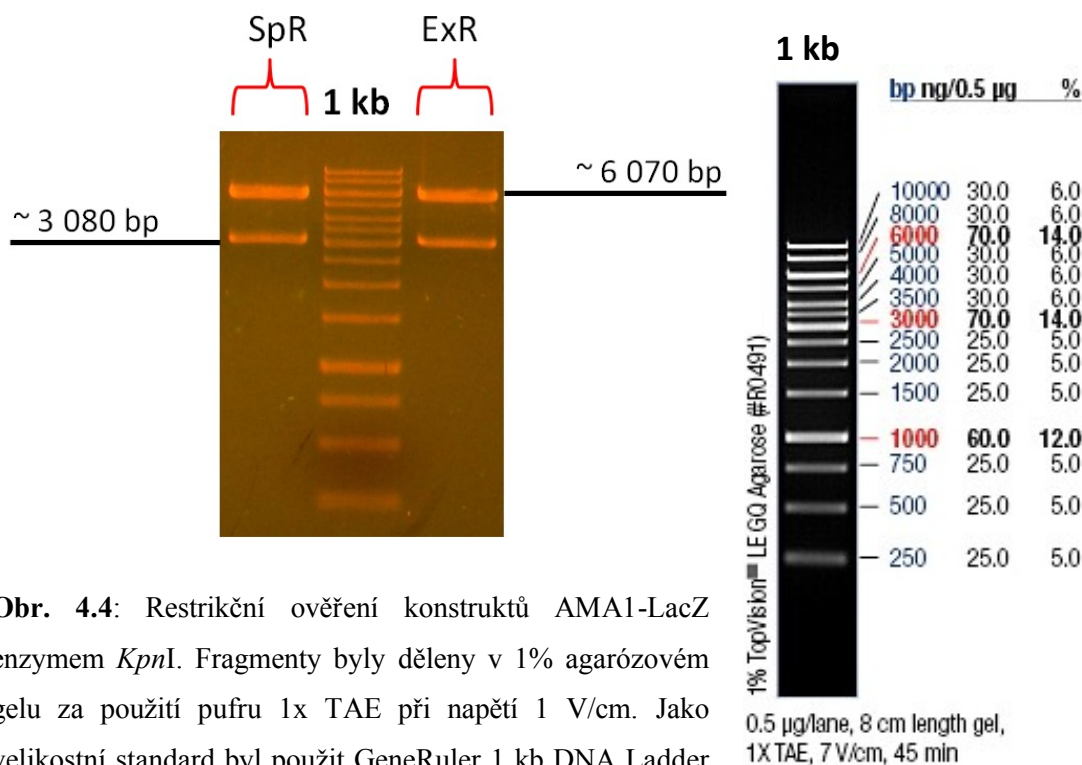
Systém AMA1-LacZ ale sestával pouze ze dvou reportérů, a to sice ze sestřihového reportéru (SpR) a exportérového reportéru (ExR). Oproti systému AMA1-CUP1 však chyběl mutovaný exportérový reportér (ExR-AU). Pro kompletaci všech získaných výsledků bylo tedy zapotřebí tento reportérový plasmid vytvořit.

Plasmidové konstrukty AMA1-LacZ byly nejprve transformovány do bakterií *E. coli* elektroporací a po kultivaci na selekčním médiu s ampicilinem byly plasmidy z buněk izolovány alkalickou metodou. Oba plasmidy byly poté restrikně ověřeny pomocí enzymu *KpnI*. Gen *CUP1* byl totiž nahrazen genem *LacZ* právě přes *KpnI* místa a štěpením by tedy měl vzniknout fragment odpovídající genu *LacZ* (~ 3 080 bp) a fragment odpovídající délce zbylé části plasmidu (~ 6 070 bp). Velikosti jednotlivých fragmentů odpovídaly tomuto teoretickému předpokladu (Obr. 4.4). Restrikním štěpením dvojicí enzymů *EcoRI* a *SalI* by vznikly dva fragmenty o podobné velikosti, proto tentokrát nebylo aplikováno.

Složení restrikční směsi:

1 μ l *Kpn*I
 2 μ l pufru *Kpn*I
 1 μ l plasmidu ($\sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 16 μ l vody

Celkem: 20 μ l



Obr. 4.4: Restrikční ověření konstruktů AMA1-LacZ enzymem *Kpn*I. Fragmenty byly děleny v 1% agarózovém gelu za použití pufru 1x TAE při napětí 1 V/cm. Jako velikostní standard byl použit GeneRuler 1 kb DNA Ladder (v obr. značen jako 1 kb). SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ.

Po ověření byl exportérový reportér (ExR) AMA1-LacZ opět štěpen enzymem *Kpn*I, vzniklé fragmenty byly rozděleny elektroforeticky v 1% agarózovém gelu a fragment odpovídající genu *LacZ* byl z gelu extrahován pomocí komerční sady NucleoSpin Extract II. Následně byl štěpení enzymem *Kpn*I podroben i mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) AMA1-CUP1. Ten byl ale po skončení reakce navíc opůsoben alkalickou fosfatázou (Shrimp alkaline phosphatase „SAP“), aby se při následné ligaci nemohl vektor uzavřít bez inzertu. Vzniklé fragmenty byly opět rozděleny elektroforeticky v 1% agarózovém gelu a fragment odpovídající zbytku

plasmidu bez genu *CUP1* byl z gelu extrahován pomocí komerční sady NucleoSpin Extract II.

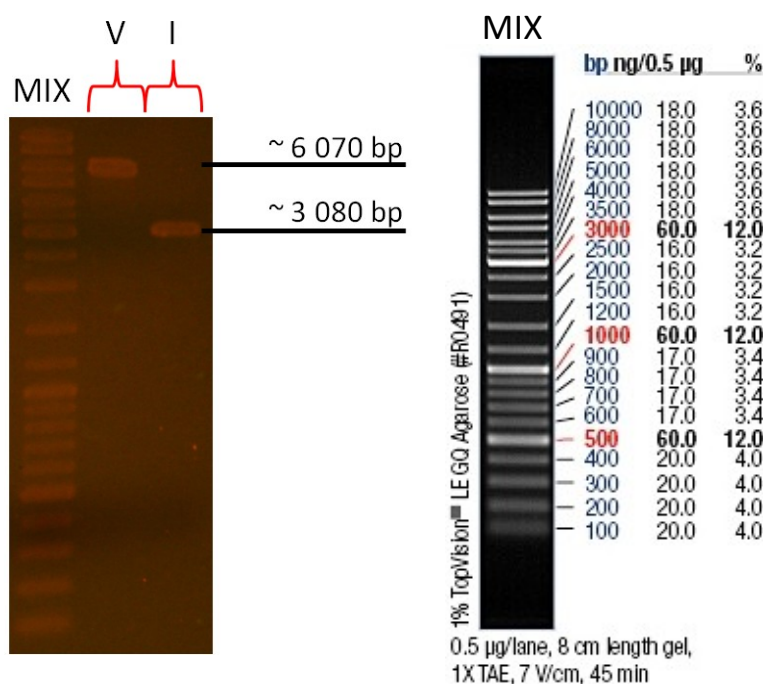
Složení restrikčních směsí:

	AMA1-CUP1 (ExR-AU)	AMA1-LacZ (ExR)
	1,5 μ l <i>Kpn</i> I	1,5 μ l <i>Kpn</i> I
	5 μ l pufru <i>Kpn</i> I	5 μ l pufru <i>Kpn</i> I
	2,5 μ l plasmidu (\sim 3 μ g/ μ l)	5 μ l plasmidu (\sim 1,5 μ g/ μ l)
	41 μ l vody	38,5 μ l vody
Celkem:	50 μ l	50 μ l
	(+ 2 μ l SAP)	

Izolované fragmenty byly kvůli určení koncentrace DNA podrobeny elektroforetické analýze v 1% agarózovém gelu (Obr. 4.5). Koncentrace byla přibližně 60 ng/ μ l v případě vektoru (V; fragment plasmidu AMA1-CUP1 ExR-AU bez genu *CUP1*) a 40 ng/ μ l v případě inzertu (I; fragment plasmidu AMA1-LacZ ExR představující gen *LacZ*). Vektor i inzert byly ligovány ve dvou ligačních směsích. V prvním případě bylo použito 100 ng vektoru a 100 ng inzertu. Ve druhém případě bylo použito 200 ng vektoru a 200 ng inzertu. Ligační směsi byly následně použity pro transformaci bakterií *E. coli* elektroporací. Po kultivaci bakterií na selekčním médiu s ampicilinem byl z několika vybraných buněčných kolonií produkt ligace izolován pomocí komerční sady NucleoSpin Plasmid.

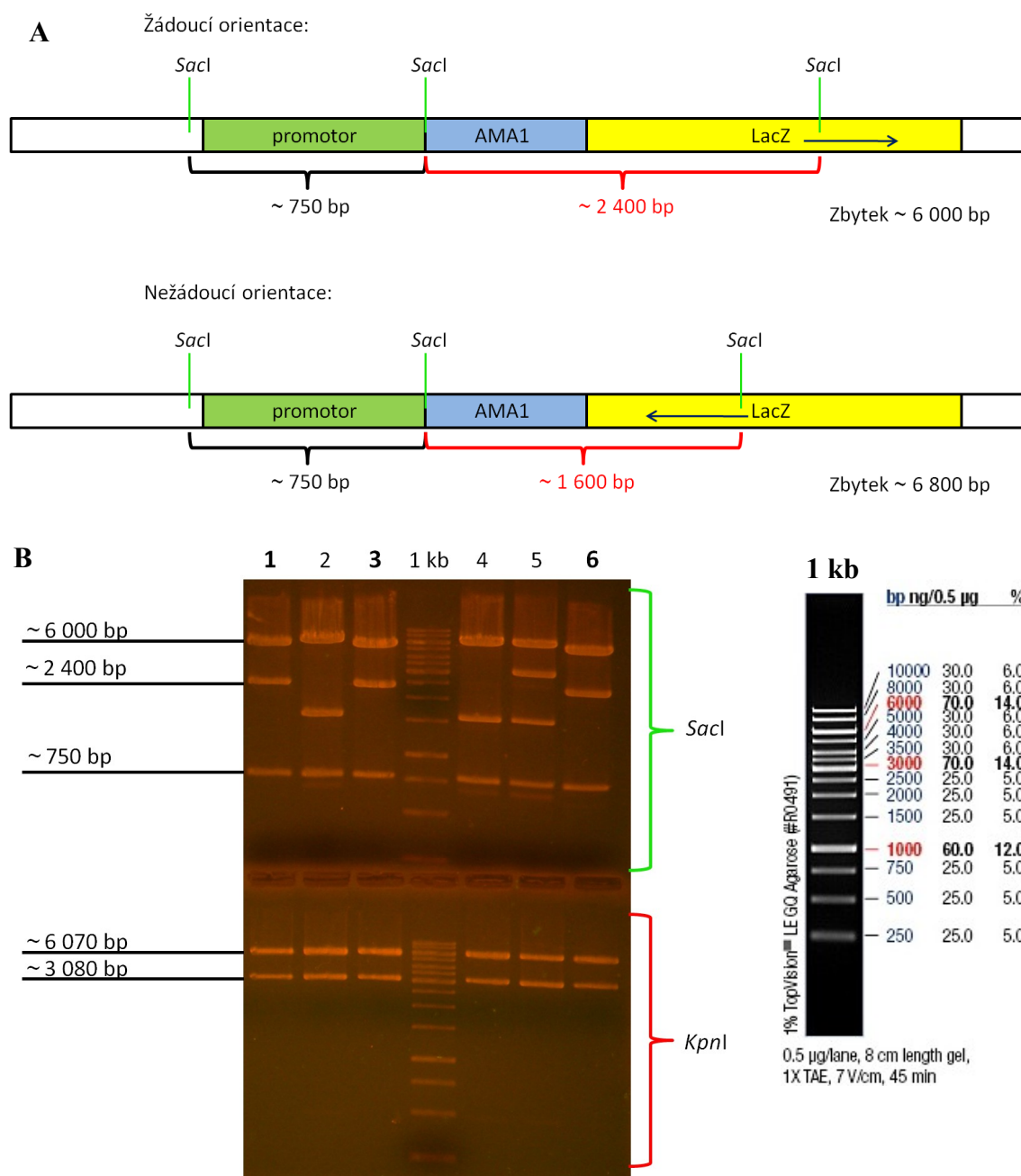
Složení ligačních směsí:

	0,4 μ l T4 DNA ligázy	0,4 μ l T4 DNA ligázy
	1 μ l ligačního pufru	1 μ l ligačního pufru
	3,2 μ l V (60 ng/ μ l)	1,6 μ l V (60 ng/ μ l)
	5 μ l I (40 ng/ μ l)	2,5 μ l I (40 ng/ μ l)
	0,4 μ l vody	4,5 μ l vody
Celkem:	10 μ l	10 μ l



Obr. 4.5: Určení koncentrace DNA prostřednictvím elektroforetické analýzy. Fragmenty byly analyzovány v 1% agarózovém gelu za použití pufru 1x TAE při napětí 1 V/cm. Jako velikostní standard byl použit GeneRuler DNA Ladder Mix (v obr. značen jako MIX). Na gel bylo naneseno 2,5 µl vektoru (V; fragment plasmidu AMA1-CUP1 ExR-AU bez genu *CUP1*), a 2,5 µl inzertu (I; fragment plasmidu AMA1-LacZ ExR odpovídající genu *LacZ*).

Protože ligace probíhala pouze přes jedno restrikční místo, mohlo dojít k vložení inzertu v obou orientacích, z nichž pouze jedna byla žádoucí. Mohlo také dojít k vložení vyššího počtu inzertů, případně, selhala-li fosfatáza, mohl se vektor uzavřít bez inzertu. Z izolovaných produktů ligace bylo tedy třeba vybrat ten správný plasmid. Za tímto účelem byly plasmidy podrobeny dvěma restrikčním štěpením - enzymem *KpnI* a enzymem *SacI* (Obr. 4.6 B). Enzym *KpnI* měl pouze ověřit přítomnost genu *LacZ*, jehož vyštěpením by měl vzniknout fragment odpovídající genu *LacZ* (~ 3 080 bp) a fragment odpovídající délce zbylé části plasmidu (~ 6 070 bp). Štěpení enzymem *SacI* mělo jednoznačně určit orientaci a případně i množství vložených inzertů. Pokud byl inzert v žádoucí orientaci, potom při štěpení vznikly tři fragmenty o velikostech ~ 750 bp, ~ 2 400 bp a ~ 6 000 bp. Pokud byl inzert v nežádoucí orientaci, pak měly tři vzniklé fragmenty velikosti ~ 750 bp, ~ 1 600 bp a ~ 6 800 bp (Obr. 4.6 A). V případě vyššího počtu inzertů vznikly místo tří fragmentů fragmenty čtyři.



Obr. 4.6: Restrikční ověření produktů ligace. **A** - schématické znázornění štěpení plasmidu AMA1-LacZ restrikčním enzymem *SacI*. Tímto způsobem byl plasmid rozštěpen na tři části, díky nimž bylo možné spolehlivě rozlišit žádoucí a nežádoucí orientaci inzertu (gen *LacZ*). Horní panel znázorňuje žádoucí orientaci, spodní panel nežádoucí orientace. **B** - plasmidy vzešlé z ligace byly štěpeny restriktázou *SacI* (horní část gelu) a restriktázou *KpnI* (spodní část gelu). Fragmenty byly analyzovány v 1% agarózovém gelu za použití pufru 1x TAE při napětí 1 V/cm. Jako velikostní standard byl použit GeneRuler 1 kb DNA Ladder (v obr. značen jako 1 kb).

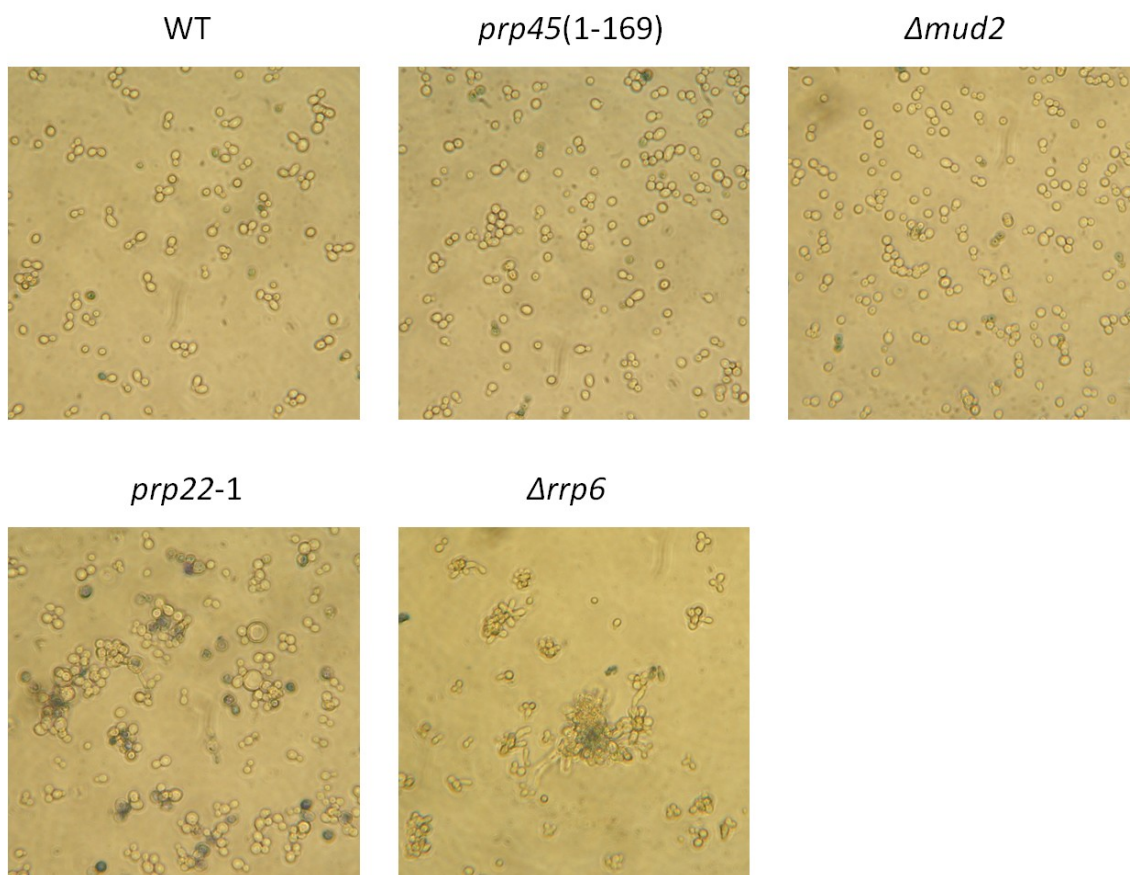
Štěpení enzymem *KpnI* ukázalo, že všechny plasmidy obsahovaly gen *LacZ* (žádný vektor se neligoval bez inzertu). Z restrikčního štěpení enzymem *SacI* zase vyplynulo, že vzorky č. 1, 3 a 6 měly inzert v žádoucí orientaci (hledaný plasmid ExR-AU AMA1-LacZ), kdežto vzorky č. 2 a 4 jej měly v nežádoucí orientaci a vzorek č. 5 měl minimálně dva inzerty v jednom vektoru (Obr. 4.6 B).

Po nalezení správných plasmidů AMA1-LacZ ExR-AU byly dva z nich odeslány k sekvenování do laboratoře sekvenace. Protože gen *LacZ* byl mnohem větší než gen *CUP1*, a celý úsek fúzního genu *AMA1-LacZ* by nebylo možné sekvenovat z jednoho primeru, tak byly k sekvenaci použity dva komerční primery. Z primeru T3 se sekvenovala koncová část genu *LacZ* pro ověření jeho přítomnosti a správné orientace, zatímco z primeru T7 promotor se sekvenovala přední část s promotorem a fragmentem genu *AMA1* pro ověření mutací v genu *AMA1*.

Po úspěšném ověření sekvence byly plasmidy AMA1-LacZ transformovány lithium-acetátovou metodou do buněk BY4741 (WT; buňky s nemutovanou alelou genu *PRP45*), AVY17 (buňky s mutantní alelou *prp45(1-169)*), Y04923 (Δ *mud2*; buňky s delecí chromosomálního genu *MUD2*), KGY2847 (*prp22-1*; buňky s mutantní alelou genu *PRP22*) a YOR001w (Δ *rrp6*; buňky s delecí chromosomálního genu *RRP6*). Pokaždé byly transformovány dva plasmidy, a to sice jeden konstrukt AMA1-LacZ (SpR, ExR nebo ExR-AU) a jeden plasmid R1070 (+Mer1) či R1130 (-Mer1). Buňky byly poté kultivovány na selekčním médiu SD bez leucinu a uracilu (SD-L-U). Aliquot buněk byl uložen při teplotě -80 °C v podobě glycerolových konzerv.

Kmeny BY4741 a AVY17 se podobaly kmenům 46 Δ *CUP* a MHY04. Neměly však deletovány chromosomální geny *CUP*. Kmeny Y04923, KGY2847 a YOR001w byly použity pro porovnání efektu mutace *prp45(1-169)* (AVY17) s efektem delecce Δ *rrp6* (YOR001w), delecce Δ *mud2* (Y04923) a mutace *prp22-1* (KGY2847). Protein Mud2 se účastní prvního kroku sestřihu pre-mRNA (kapitola 2.2.2) a buňky Δ *mud2* tedy měly ukázat chování reportérového systému AMA1-LacZ v případě, že je tento krok porušen. Protein Prp22 se účastní druhého kroku sestřihu (kapitola 2.1) a buňky *prp22-1* by tedy měly ukázat chování reportérového systému AMA1-LacZ v případě, že je poškozena tato část sestřihu. A protein Rrp6 je důležitou součástí jaderného exosomu (kapitola 2.2.4), přičemž buňky Δ *rrp6* sloužily pro ověření, zdali jaderná degradace RNA neovlivňuje významným způsobem pokusy s konstrukty AMA1-LacZ.

U všech buněčných kmenů transformovaných plasmidy AMA1-LacZ byla provedena analýza aktivity β -galaktosidázy. Protože ale buňky *prp22-1* a Δ *rrp6* vykazovaly výrazné tvarové abnormality a měly tendenci vytvářet shluky (Obr. 4.7), byly výsledky kvůli obavám z vlivu jejich morfologie na hodnoty optických denzit korigovány podle koncentrací proteinů v jednotlivých vzorcích. Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byly měřeny na nanodropu (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) při vlnové délce 280 nm a přepočteny na hodnotu 3 mg/ml.



Obr. 4.7: Fotografie kmenů kvasinky *S. cerevisiae* použitých při práci s plasmidovými konstrukty AMA1-LacZ. K buňkám byl krátce před snímáním přidán roztok methylenové modři, který obarvil mrtvé buňky do modra. WT = BY4741, *prp45(1-169)* = AVY17, Δ *mud2* = Y04923, *prp22-1* = KGY2847, Δ *rrp6* = YOR001w. U buněk *prp22-1* a Δ *rrp6* jsou dobře viditelné morfologické abnormality. Snímky byly pořízeny fotoaparátem Olympus SP350 na mikroskopu Olympus CK2 při zvětšení 10x40.

Analýza aktivity β -galaktosidázy byla pro každý typ transformovaných buněk provedena třikrát až čtyřikrát a jejich průměrné hodnoty i s příslušnými směrodatnými odchylkami byly vyneseny do sloupcového grafu (Obr. 4.8 A). Výsledky analýzy

u kmenů BY4741 (WT) a AVY17 (*prp45(1-169)*) byly ve shodě s poznatky získanými při práci s konstrukty AMA1-CUP1 na kmenech 46Δ*CUP* (WT) a MHY04 (*prp45(1-169)*). Mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) AMA1-LacZ ve WT buňkách a *prp45(1-169)* buňkách vykazoval nejvyšší aktivitu β-galaktosidázy u obou kmenů a výsledky nebyly ovlivněny přítomností proteinu Mer1. Podobně vysokou aktivitu měl však i reportér ExR -Mer1 u buněk *prp45(1-169)*. Sestřihový reportér (SpR) vykazoval v souladu s teorií vyšší aktivitu β-galaktosidázy za přítomnosti proteinu Mer1, který posiluje sestřih meiotického genu *AMA1*, než bez něj. A obdobně jako u reportéru AMA1-CUP1 vykazovaly vyšší úroveň signálu WT buňky (*PRP45*) ve srovnání s buňkami *prp45(1-169)*. Exportérový reportér (ExR) se potom choval inverzně k sestřihovému reportéru. Nepřítomnost proteinu Mer1 (plasmid R1130) měla za následek vyšší aktivitu β-galaktosidázy ve srovnání s buňkami exprimujícími Mer1 (plasmid R1070) a WT buňky s těmito reportéry měly v obou případech nižší aktivitu oproti buňkám *prp45(1-169)*. Díky lepší kvantifikaci bylo tedy možné pozorovat jistý rozdíl mezi těmito kmeny i v případě reportéru ExR za nepřítomnosti proteinu Mer1, který u konstruktů AMA1-CUP1 příliš viditelný nebyl.

U buněk Δ*rrp6* se očekávalo celkové zvýšení aktivity β-galaktosidázy v důsledku poruchy degradace RNA v jádře. Místo toho ale došlo ke snížení signálu ve všech případech oproti WT buňkám. K největšímu snížení došlo u obou exportérových reportérů (ExR), kde opět buňky bez proteinu Mer1 měly vyšší aktivitu β-galaktosidázy než buňky s proteinem Mer1. K velkému snížení oproti WT buňkám došlo i u mutovaných exportérových reportérů (ExR-AU), který není ovlivňován proteinem Mer1. Nejmenší snížení aktivity β-galaktosidázy bylo vidět u sestřihových reportérů (SpR), kde se i tentokrát s přítomností proteinu Mer1 zvyšovala aktivita. U buněk SpR +Mer1 potom hladina aktivity β-galaktosidázy překročila i hladinu aktivity buněk s exportérem ExR-AU, které měly dosahovat teoretického maxima (Obr. 4.8 A).

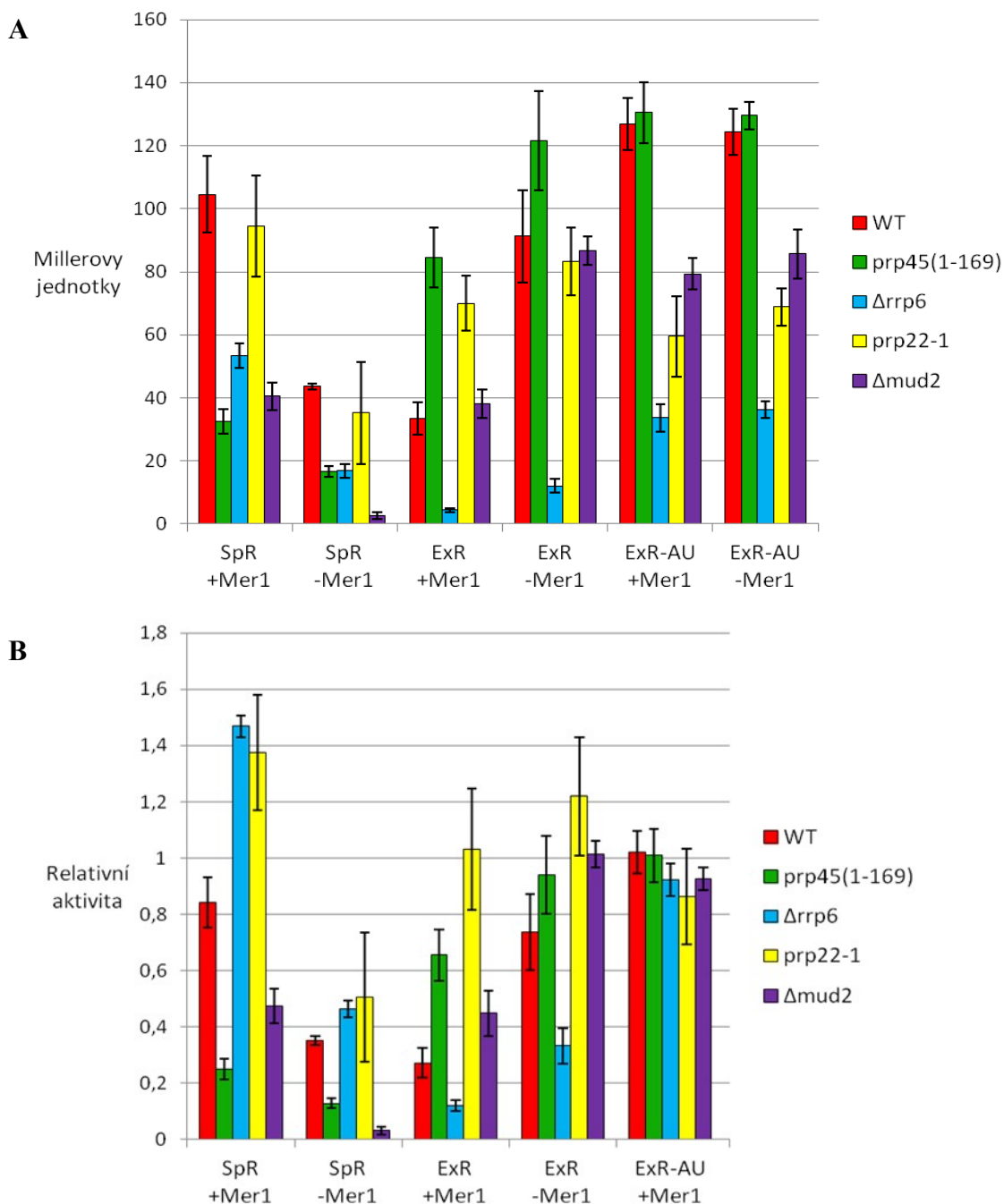
Podobného výsledku bylo dosaženo i při pokusech s buňkami *prp22-1*, kdy nejvyšší hladiny aktivity dosáhl opět sestřihový reportér za přítomnosti proteinu Mer1 (SpR -Mer1). Zajímavé však bylo, že nejnižší hladiny aktivity β-galaktosidázy bylo u těchto buněk dosaženo také sestřihovým reportérem, tentokrát však za nepřítomnosti proteinu Mer1 (SpR -Mer1), což se u jiného testovaného kmene nestalo. Oproti tomu u exportérových reportérů (ExR) byla změna aktivity v závislosti na přítomnosti proteinu Mer1 téměř neznatelná. Buňky ExR -Mer1 měly sice mírně zvýšenou aktivitu

vzhledem k buňkám ExR +Mer1, tento rozdíl byl však podobně velký jako rozdíl mezi buňkami s reportéry ExR-AU +Mer1 a ExR-AU -Mer1, u nichž by protein Mer1 neměl mít vliv na hladinu exprese fúzního genu *AMAI-LacZ*. Při srovnání reportérů ExR a ExR-AU bylo pak dokonce vidět, že buňky *prp22-1* s reportérem ExR (s proteinem Mer1 i bez něj) měly mírně vyšší aktivitu β -galaktosidázy oproti buňkám s reportérem ExR-AU, což také nebylo pozorováno u jiného kmene. Pokud se ale oba typy reportérů (ExR a ExR-AU za přítomnosti proteinu Mer1 i bez něj) porovnávaly s ohledem na poměrně malé rozdíly, které mezi nimi byly, tak to vypadalo, že všechny vykazovaly přibližně stejně vysokou aktivitu. Srovnání WT buněk a buněk *prp22-1* pak ukázalo, že buňky *prp22-1* měly nižší aktivitu než WT buňky u všech reportérů, s výjimkou reportéru ExR za nepřítomnosti proteinu Mer1, kdy buňky *prp22-1* vykazovaly asi dvojnásobnou aktivitu oproti WT buňkám (Obr. 4.8 A).

Nižší aktivitu ve srovnání s WT buňkami měly i buňky *Amud2*, s výjimkou reportéru ExR (za přítomnosti proteinu Mer1 i bez něj), jehož aktivita byla srovnatelná u obou kmenů. U buněk *Amud2* byl také vidět extrémně velký efekt proteinu Mer1, a to sice na sestřih reportéru SpR. Buňky SpR -Mer1 vykazovaly nejnižší aktivitu β -galaktosidázy z celého pokusu, zatímco buňky SpR +Mer1 měly aktivitu mnohem vyšší, i když stále relativně nízkou (srovnatelnou s aktivitou buněk *prp45(1-169)*). Mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) potom opět nebyl ovlivňován proteinem Mer1, ale aktivita buněk *Amud2* s tímto reportérem byla nižší v porovnání s WT buňkami. Zajímavé však bylo, že buňky ExR-AU -Mer1, ExR-AU +Mer1 i ExR -Mer1 měly stejnou aktivitu enzymu β -galaktosidázy, což bylo možné pozorovat i u buněk *prp45(1-169)* (Obr. 4.8 A).

Aby bylo možné porovnat chování jednotlivých kmenů v tomto pokusu bez ohledu na absolutní hladinu exprese β -galaktosidázy, tak byla provedena normalizace původního grafu (Obr. 4.8 A), kdy hodnota mutovaného exportérového reportéru bez proteinu Mer1 (ExR-AU -Mer1) byla u každého kmene určena rovna jedné, a hodnoty zbylých reportérů daného kmene byly podle ní upraveny tak, aby byl zachován jejich vzájemný poměr (Obr. 4.8 B). Na tomto grafu byla potom velmi dobře patrná zvýšená exprese β -galaktosidázy ze sestřihového reportéru za přítomnosti proteinu Mer1 (SpR +Mer1) u buněk *prp22-1* a *Arrp6*, stejně jako její zvýšená exprese u buněk *prp22-1* v případě exportérového reportéru (ExR +Mer1 i ExR -Mer1), snížená exprese u buněk *Arrp6* v případě exportérového reportéru (ExR +Mer1 i ExR -Mer1) a

prakticky nulová exprese enzymu u buněk *Δmud2* SpR -Mer1. Také si zde bylo možné všimnout, že směrodatné odchylky dosáhly nejvyšších hodnot u pokusů s buňkami *prp22-1*, s nimiž se nejhůře pracovalo a výsledky byly méně repetitivní.



Obr. 4.8: Výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupcových grafů. Při analýze byly použity kmeny WT = BY4741, *prp45(1-169)* = AVY17, *Arrp6* = YOR001w, *prp22-1* = KGY2847, $\Delta mud2$ = Y04923. Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. **A** - průměrné hodnoty aktivit enzymu β -galaktosidázy v Millerových jednotkách se směrodatnými odchylkami vypočtenými podle návodu v kapitole 3.2.11. **B** - průměrné hodnoty aktivit enzymu β -galaktosidázy normalizované na hodnotu ExR-AU -Mer1.

4.3 Analýza RNA u buněk s konstrukty AMA1-LacZ

Pro ověření výsledků získaných při práci s konstrukty AMA1-LacZ byla provedena analýza buněčné RNA u všech typů buněk použitých v minulém experimentu. Kmeny BY4741 (WT), AVY17 (*prp45*(1-169)), Y04923 (Δ *mud2*), KGY2847 (*prp22*-1) a YOR001w (Δ *rrp6*) s příslušnými plasmidy (SpR = sestřihový reportér, ExR = exportérový reportér, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130) byly kultivovány v tekutém selekčním médiu SD-L-U. Po následném stočení (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 5 min, 20 °C) byla z buněk izolována celková RNA pomocí soupravy MasterPure Yeast Purification Kit. Tato RNA byla dále převedena na cDNA pomocí soupravy RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit za použití náhodných hexanukleotidů jako primerů. K namnožení cDNA fúzního genu *AMA1-LacZ* byly potom při následné PCR použity primery OG243 a OG244. Směs na PCR byla připravena dvěma způsoby v závislosti na koncentraci cDNA, kterou se podařilo získat. Z WT buněk a buněk *prp45*(1-169) byla získána cDNA o koncentraci 150 ng/μl, kdežto z buněk Δ *mud2*, *prp22*-1 a Δ *rrp6* byla získána cDNA o koncentraci 75 ng/μl.

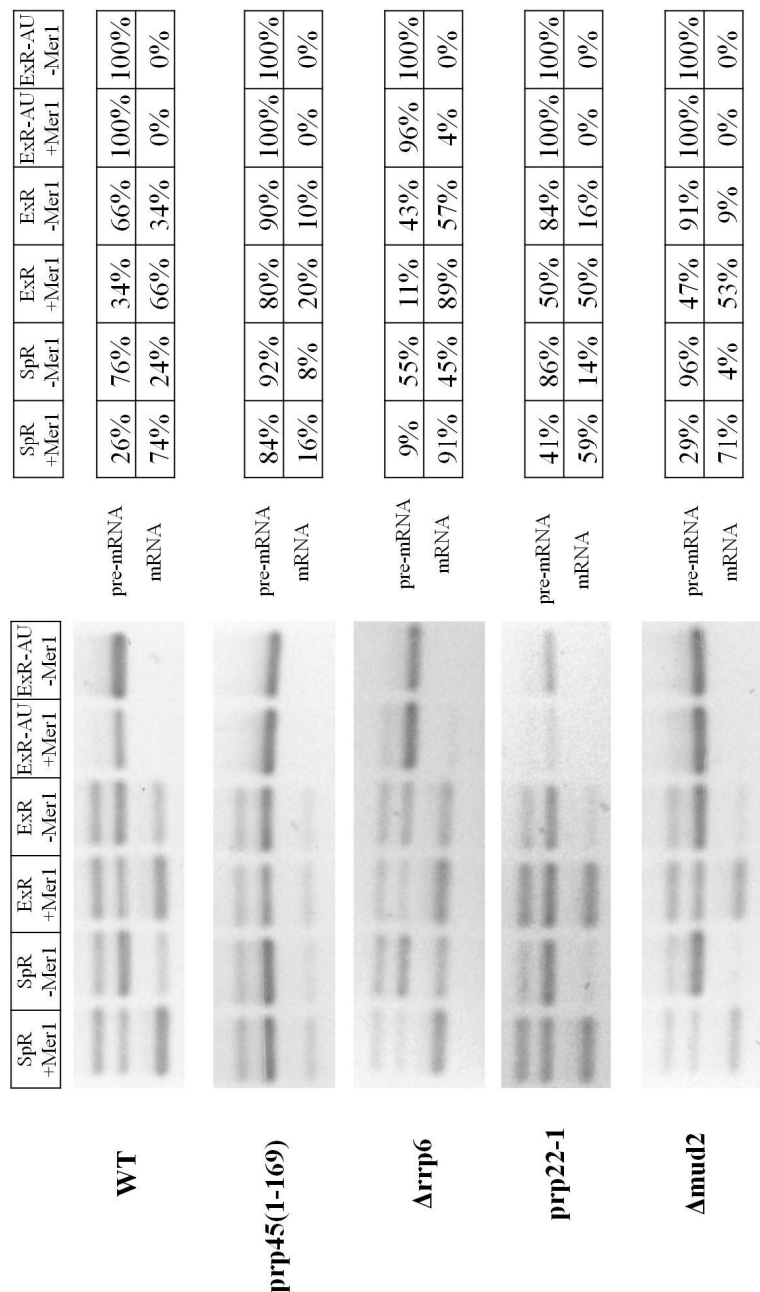
Složení PCR směsí:

1,5 μl cDNA (150 ng/μl)	3 μl cDNA (75 ng/μl)
2 μl dNTP Mix	2 μl dNTP Mix
2 μl 10x reakčního pufru	2 μl 10x reakčního pufru
2 μl MgCl ₂	2 μl MgCl ₂
2 μl primeru OG243 (10 mM)	2 μl primeru OG243 (10 mM)
2 μl primeru OG244 (10 mM)	2 μl primeru OG243 (10 mM)
0,1 μl Taq polymerázy	0,1 μl Taq polymerázy
8,5 μl vody	7 μl vody
Celkem: 20,1 μl	20,1 μl

Produkty PCR byly následně elektroforeticky analyzovány na 2% agarózovém gelu, snímány fotoaparátem Panasonic DMC-FZ7 a po úpravě snímků programem Adobe Photoshop byly jednotlivé proužky na gelu kvantifikovány počítačovým programem ImageQuant TL (Obr. 4.9).

Z těchto výsledků bylo patrné, že největší procento transkriptů *AMA1-LacZ* bylo sestřiženo u buněk *Arrp6*. Oproti tomu nejmenší část transkriptů byla sestřižena v případě buněk *prp45(1-169)* a extrémně nízká část pre-mRNA byla sestřižena u buněk *Amud2* za nepřítomnosti proteinu Mer1 (SpR -Mer1 a ExR -Mer1). Snížená úroveň sestřihu byla patrná i v případě buněk *prp22-1*.

Na absolutní koncentraci sestřižené mRNA a nesestřižené pre-mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ* nebylo možné z tohoto pokusu usuzovat, pouze na relativní poměry mezi těmito typy RNA. Relativní poměry však nebyly příliš přesné, protože část transkriptů mezi sebou pravděpodobně párovala za vzniku nejhornějšího ze tří proužků na gelu (Obr. 4.9). To podporovala i skutečnost, že tento proužek nebyl přítomen ve vzorcích, u nichž nedocházelo k sestřihu, a které tudíž obsahovaly pouze pre-mRNA. Výsledky analýzy buněčné RNA tak byly spíše orientační.



Obr. 4.9: Výsledky analýzy RNA u buněk *S. cerevisiae* s konstrukty AMA1-LacZ. Použity byly kmeny WT = BY4741, *prp45*(1-169) = AVY17, *Arrp6* = YOR001w, *prp22-1* = KGY2847 a *Amud2* = Y04923. Každý typ buněk nesl dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. PCR produkty byly elektroforeticky analyzovány v 1% agarózovém gelu (vlevo) za použití pufru 1x TAE při napětí 1 V/cm. Jejich snímky byly upraveny programem Adobe Photoshop a následně kvantifikovány programem ImageQuant TL (vpravo). Prostřední proužek v gelu je nesestřižená pre-mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ*, spodní proužek je sestřižená mRNA fúzního genu AMA1-LacZ a vrchní proužek je pravděpodobně mRNA párující s pre-mRNA. V tabulce je potom uveden poměr mezi sestřiženou mRNA a nesestřiženou pre-mRNA.

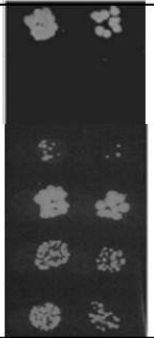
5 Diskuse

Cílem této práce bylo přispět k poznání proteinu Prp45 kvasinky *S. cerevisiae*. Předmětem výzkumu byla především jeho účast na sestřihu pre-mRNA a možný vliv na export pre-mRNA z jádra. Dřívější výzkumy totiž odhalily, že buňky s mutovanou alelou *prp45*(1-169) akumulovaly větší množství pre-mRNA s mutací v BS sekvenci, a více lasovitých intermediátů v případě transkriptů s mutovaným 5' a 3' sestřihovým místem. Sestřih kanonických intronů u buněk s alelou *prp45*(1-169) ovlivněn nebyl (Gahura et al., 2009). Vztah proteinu Prp45 a sestřihu byl tedy nepopiratelný, ovšem akumulace pre-mRNA nadnesla otázku možného podílu tohoto proteinu na exportu RNA z jádra do cytoplasmy. K následným pokusům byl posléze vybrán gen *AMA1*, který obsahuje atypický intron, k jehož účinnému sestřihu je zapotřebí přítomnost meiotického proteinu Mer1 (Davis et al., 2000).

Pro další osvětlení výše zmíněných otázek byla tedy použita sada plasmidových konstruktů *AMA1-CUP1*, u nichž se sestřih a následný export RNA fúzního genu *AMA1-CUP1* projevil změnou schopnosti buněk přežít na médiu s ionty Cu^{2+} . Také byla použita sada plasmidových konstruktů *AMA1-LacZ*, u nichž se sestřih a následný export RNA fúzního genu *AMA1-LacZ* projevil po přidání vhodného substrátu (ONPG) změnou zbarvení buněčného lyzátu (kapitola 3.1.10). Pro podporu dosažených výsledků byla provedena i analýza pre-mRNA a mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ*.

5.1 Analýza sestřihu a exportu mutantů *prp45*(1-169) s využitím konstruktů *AMA1-CUP1*

Sada konstruktů *AMA1-CUP1* byla darem od laboratoře Marca Spingoly (Scherrer a Spingola, 2006) a výsledky dosažené v této práci s použitím kmene *46ΔCUP* souhlasily s výsledky pokusů provedených v laboratoři Marca Spingoly na kmeni KH46. Buňky se sestřihovým reportérem (SpR) rostly lépe za přítomnosti proteinu Mer1, oproti tomu buňky s exportérovým reportérem (ExR) rostly lépe bez něj a růst buněk s mutovaným exportérovým reportérem (ExR-AU) nebyl proteinem Mer1 ovlivněn (Obr. 5.1).

Reportér	Mer1	KH46	
SpR	+		
SpR	-		
ExR	+		
ExR	-		
ExR-AU	+		
ExR-AU	-		
Ředění		1	1/10

Obr. 5.1: Růst buněk *S. cerevisiae* kmene KH46 (Δcup) na médiu se zvýšenou koncentrací iontů Cu^{2+} (0,1 mM v případě SpR, 0,15 mM v případě ExR a ExR-AU). První sloupec značí použitý reportér (SpR = sestřihový reportér, ExR = exportérový reportér, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér), druhý sloupec značí přítomnost proteinu Mer1 (+ znamená přítomen, - znamená nepřítomen), ve spodním řádku je zobrazeno ředění. Upraveno podle Scherrer a Spingola, 2006.

Z výsledků analýzy citlivosti buněk k Cu^{2+} iontům bylo patrné, že buňky s prázdným plasmidem pRS316 bez inzertu obsahujícího gen *CUP1* (PP) nevykazovaly prakticky žádnou odolnost k měďnatým iontům. Bez ohledu na použitý kmen ($46\Delta CUP$ nebo MHY04) a bez ohledu na přítomnost proteinu Mer1 skoro vůbec nerostly už při 0,2 mM koncentraci Cu^{2+} (Obr. 4.2). Oproti tomu kvasinky *S. cerevisiae* s přirozenými kopiemi *CUP* genů přítomnými v chromosomální DNA prosperovaly i na médiu s 1 mM koncentrací Cu^{2+} (Obr. 4.3), opět bez ohledu na použitý kmen (EGY48 nebo EH2). Buňky postrádající gen *CUP1* rostly maximálně na médium s 0,4 mM koncentrací Cu^{2+} , a to v přítomnosti mutovaného exportérového reportéru (ExR-AU; Obr. 4.2), takže dosahovaly mnohem nižší odolnosti než kmeny EGY48 (WT) a EH2 (*prp45*(1-169)).

Z výsledků analýzy dále není patrný žádný vliv proteinu Prp45 na export pre-mRNA fůzního genu *AMA1-CUP1* z jádra do cytoplasmy. Kdyby totiž mutantní alela *prp45*(1-169) ovlivňovala export pre-mRNA z jádra, projevilo by se to u buněk $46\Delta CUP$ a MHY04 nesoucích mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) rozdílnou schopností růstu na médiu s měďnatými ionty. Všechny buňky s tímto reportérem ale rostly stejně dobře (Obr. 4.2).

Schopnost růstu buněk se sestřihovým reportérem (SpR) a exportérovým reportérem (ExR) na médiu s Cu^{2+} potvrdila úlohu proteinu Prp45 v sestřihu pre-mRNA (tentokrát v souvislosti s genem *AMA1*). Buňky $46\Delta CUP$ nesoucí sestřihový reportér

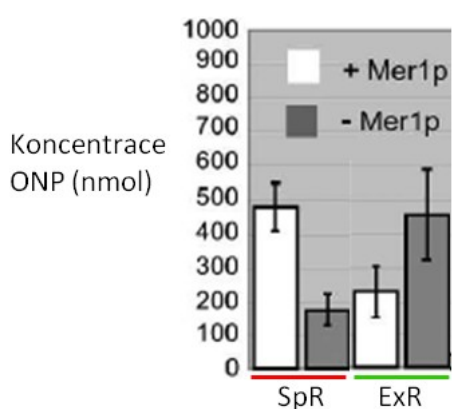
(SpR) za přítomnosti proteinu Mer1 i bez něj rostly lépe, než obdobné buňky kmene MHY04. To značilo zhoršený sestřih pre-mRNA fúzního genu *AMA1-CUP1* u buněk MHY04 v důsledku mutantní alely *prp45(1-169)*, protože sestřižená mRNA sestřihového reportéru (SpR) produkuje protein Cup1, který v buňkách vyvazuje ionty Cu^{2+} , čímž brání jejich toxicitě (kapitola 3.1.10). Buňky MHY04 s exportérovým reportérem (ExR) zase rostly lépe v přítomnosti proteinu Mer1 ve srovnání s obdobnými buňkami kmene $46\Delta\text{CUP}$. Z toho bylo opět možné usuzovat na horší sestřih pre-mRNA u buněk nesoucích alelu *prp45(1-169)* v souladu s tím, že nesestřižená pre-mRNA exportérového reportéru produkuje protein Cup1 (kapitola 3.1.10). Určitý rozdíl mezi kmeny MHY04 a $46\Delta\text{CUP}$ by tedy měl existovat i v případě exportérového reportéru (ExR) za nepřítomnosti proteinu Mer1. Nic takového ale pozorováno nebylo (Obr. 4.2). Zde však mohlo dojít k situaci, kdy nesestřižené pre-mRNA bylo velké množství u obou kmenů, a i když mezi těmito kmeny existoval rozdíl v procentuálním množství sestřižené mRNA fúzního genu *AMA1-CUP1*, tak absolutní rozdíl v hladinách pre-mRNA mohl být pod detekční hladinou experimentu.

Tyto poznatky přinesly další vodítko naznačující, že protein Prp45 by se mohl podílet na první transesterifikační reakci. Dosavadní výzkumy totiž zatím potvrdily pouze úlohu proteinu Prp45 ve druhé transesterifikační reakci (Gahura et al., 2009). Pokud by se však tento protein podílel pouze na druhém kroku sestřihu, tak v případě sestřihového reportéru (SpR) by sice došlo ke snížení odolnosti k Cu^{2+} v kombinaci s alelou *prp45(1-169)* ve srovnání s nemutovanou alelou *PRP45*, ale u exportérového reportéru (ExR) by nemělo dojít ke zvýšení odolnosti za přítomnosti alely *prp45(1-169)* oproti alele *PRP45*.

Poškození v některém kroku sestřihu pre-mRNA by se totiž mělo projevit snížením hladiny plně vyvráté mRNA vzhledem k celkové hladině RNA. Pokud by došlo konkrétně k poškození první transesterifikační reakce, potom by mělo dojít také ke zvýšení hladiny nepoškozené pre-mRNA vzhledem k celkové hladině RNA. Ovšem při defektu ve druhé transesterifikační reakci by množství nepoškozené pre-mRNA narůstat nemělo. Pre-mRNA by totiž měla být porušena už při předcházející transesterifikační reakci, která by v tomto případě měla být plně funkční. Pro ověření těchto teoretických předpokladů a další osvětlení možné úlohy proteinu Prp45 během první transesterifikační reakce měly posloužit pokusy s plasmidovými konstrukty *AMA1-LacZ*.

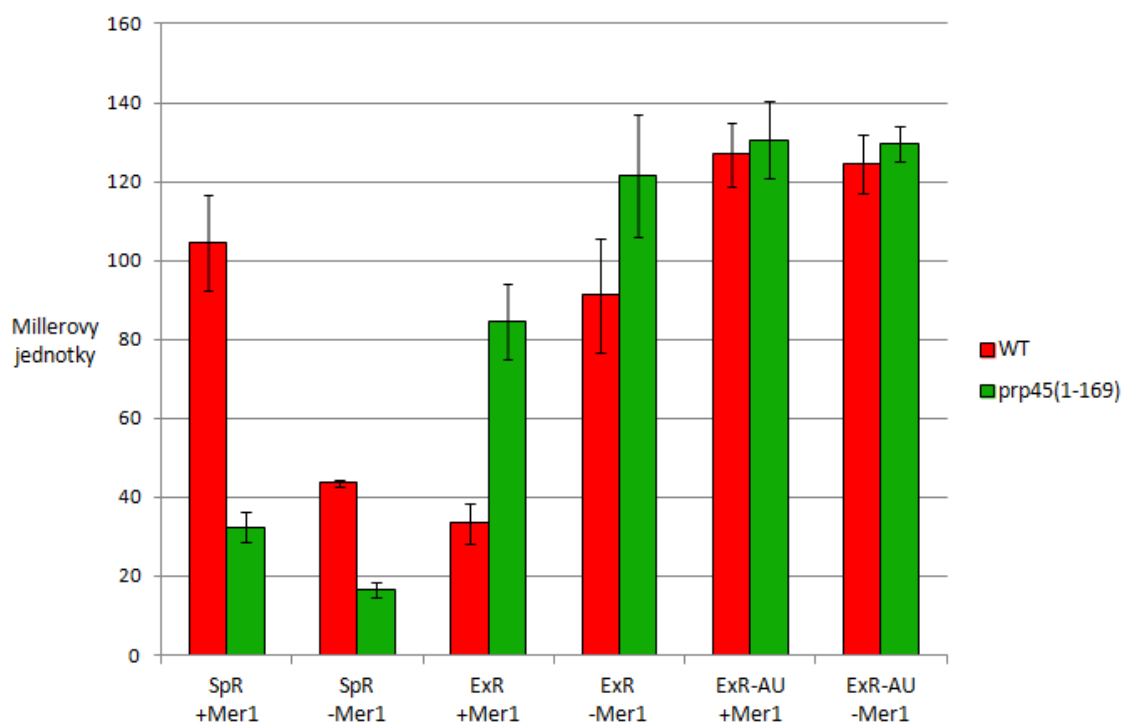
5.2 Analýza sestřihu a exportu mutanty *prp45(1-169)* s využitím konstruktů AMA1-LacZ

Sestřihový reportér (SpR) a exportérový reportér (ExR) AMA1-LacZ byly darem od laboratoře Marca Spingoly (Scherrer a Spingola, 2006), mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) byl však vyroben až v naší laboratoři. Výsledky dosažené v této práci za použití kmene BY4741 s využitím sestřihového reportéru (SpR) a exportérového reportéru (ExR) odpovídaly výsledkům pokusů provedených v laboratoři Marca Spingoly (Obr. 5.2).



Obr. 5.2: Výsledky analýzy aktivity β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupčových grafů. Při analýze byl použit kmen BY4741 (WT). Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1p = plasmid R1070, -Mer1p = plasmid R1130. Upraveno podle Scherrer a Spingola, 2006.

Poznatky získané na buňkách BY4741 (WT) a AVY17 (*prp45(1-169)*) s pomocí reportérových konstruktů AMA1-LacZ odrážely výsledky získané v pokusech s konstrukty AMA1-CUP1. Stejná úroveň aktivity β -galaktosidázy u buněk obou kmenů nesoucích mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) nenasvědčovala zapojení proteinu Prp45 do transportu pre-mRNA z jádra do cytoplasmy. Zvýšená úroveň aktivity sestřihového reportéru (SpR) a snížená úroveň aktivity exportérového reportéru (ExR) u buněk s alelou *PRP45* oproti buňkám s alelou *prp45(1-169)* potvrzovala roli proteinu Prp45 v sestřihu a ukazovala na zapojení proteinu do první transesterifikační reakce. Tentokrát byl díky lepší kvantifikaci pozorovatelný i rozdíl aktivit mezi kmeny s exportérovým reportérem za nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR -Mer1; Obr. 5.3) v souladu s dřívějším předpokladem, že tento rozdíl byl při použití konstruktů AMA1-CUP1 pod detekční hladinou experimentu. Pro větší přehlednost byly do této části diskuse zařazeny i výseky z grafů na str. 71 (Obr. 4.8).



Obr. 5.3: Výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupcového grafu. V grafu jsou uvedeny kmeny WT = BY4741 a *prp45(1-169)* = AVY17. Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Průměrné hodnoty aktivit enzymu β -galaktosidázy v Millerových jednotkách se směrodatnými odchylkami byly vypočteny podle návodu v kapitole 3.2.11. Tento graf představuje část grafu uvedeného na str. 71 (Obr. 4.8 A).

Konstrukty AMA1-LacZ byly však použity hlavně z toho důvodu, aby bylo možné zařadit do pokusu buněčné kmeny Y04923, KGY2847 a YOR001w, které nebyly k dispozici ve variantě s deletovanými chromosomálními geny *CUP*. Buňky kmene Y04923 mají prostřednictvím delece genu *MUD2* poškozenou první transesterifikační reakci sestřihu a buňky kmene KGY2847 mají prostřednictvím mutace genu *PRP22* poškozenou druhou transesterifikační reakci. Srovnání chování těchto dvou kmenů v průběhu pokusu s chováním kmenem AVY17 nesoucím alelu *prp45(1-169)* si kladlo za cíl odhalit, zdali se poškození proteinu Prp45 bude blížit spíše defektu v prvním kroku sestřihu, nebo ve druhém kroku sestřihu.

Ve dřívějších pokusech bylo také dokázáno, že pre-mRNA genu *AMA1* ani fúzního genu *AMA1-CUP1* není žádným abnormálním způsobem ovlivňována

cytoplasmatickými degradačními drahami (Scherrer a Spingola, 2006). Vliv jaderných degradačních drah ale zkoumán nebyl. V rámci této práce byly tedy použity i buňky kmene YOR001w, které mají prostřednictvím delece genu *RRP6* poškozenou degradační dráhu využívající jaderný exosom (kapitola 2.2.4). Z těchto výsledků by pak mohlo být možné odhadnout případný nestandardní vliv jaderné degradační dráhy na RNA genu *AMA1*.

Výsledky β -galaktosidázové analýzy buněk *Arrp6*, *Amud2* a *prp22-1* však nebylo snadné interpretovat. Ve všech případech byl ale stále patrný efekt proteinu Mer1 v souladu s teorií (kapitola 3.1.10). U sestřihového reportéru (SpR) β -galaktosidázová aktivita vždy rostla v přítomnosti Mer1, u exportérového reportéru (ExR) v přítomnosti Mer1 aktivita zase klesala a u mutovaného exportérového reportéru (ExR-AU) neměl protein Mer1 na aktivitu vliv (Obr. 4.8).

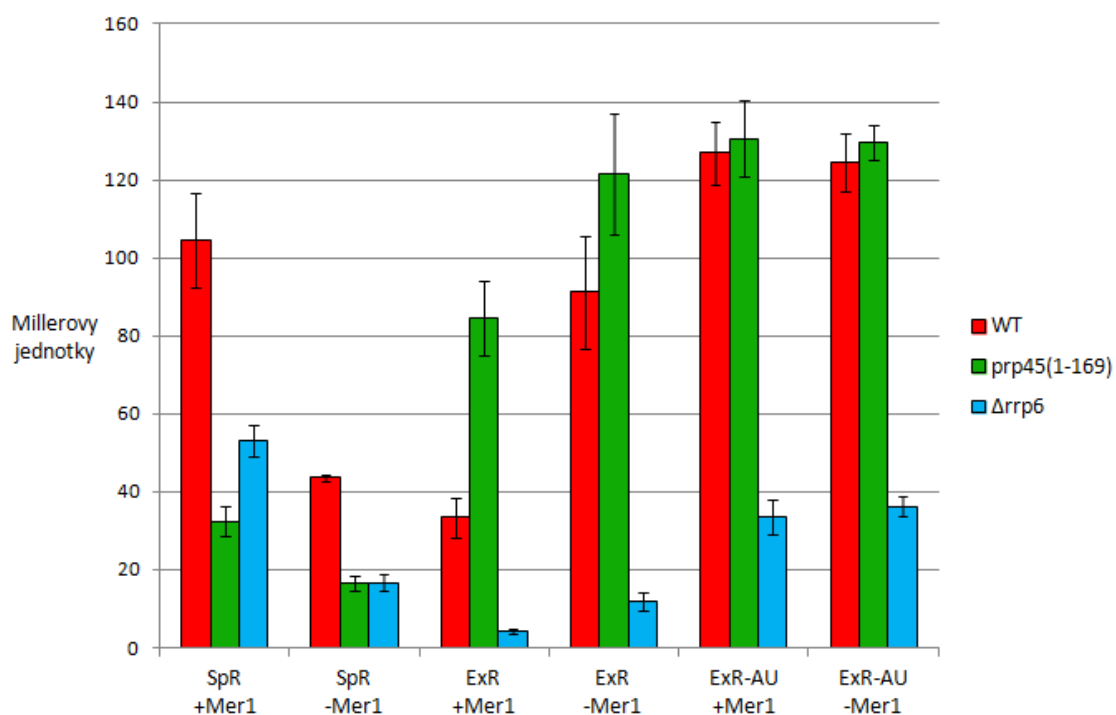
5.2.1 Analýza buněk *Arrp6* s defektem v jaderném exosomu

Protein Rrp6 je důležitou součástí jaderného exosomu (Burkard a Butler, 2000), přičemž buňky *Arrp6* měly v tomto pokusu sloužit pro ověření, zdali jaderná degradace RNA nemůže významným způsobem ovlivňovat pokusy s konstrukty *AMA1-LacZ*.

U buněk *Arrp6* obvykle dochází ke zvýšení množství RNA v cytoplasmě v důsledku poškození její degradace v jádře (Canavan a Bond, 2007), proto byl očekáván nárůst β -galaktosidázové aktivity ve všech případech ve srovnání s WT buňkami. V pokusu s konstrukty *AMA1-LacZ* ale došlo k nečekanému snížení β -galaktosidázové aktivity, zvláště potom v případě exportérového reportéru (ExR; Obr. 5.4).

Možným vysvětlením by bylo, že zvýšená koncentrace RNA v jádře zahltila transportní systém a přednostně byly exportovány běžné transkripty na úkor produktů abnormálních genů (např. RNA fúzního genu *AMA1-LacZ*), jejichž transport do cytoplasmy byl takto inhibován. Delší pobyt pre-mRNA v jádře potom mohl poskytnout více času pro její sestřih a vznik mRNA. To by vysvětlovalo velmi nízkou aktivitu exportérového reportéru (ExR), v jehož případě je enzym β -galaktosidáza překládán z neporušené pre-mRNA. Ve srovnání s tímto reportérem měl potom sestřihový reportér (SpR) relativně velmi vysokou aktivitu, protože v jeho případě je β -galaktosidáza překládána ze sestřižené mRNA. Vyšší aktivitu sestřihového reportéru za přítomnosti

proteinu Mer1 (SpR +Mer1) vzhledem k mutovanému exportérovému reportéru (ExR-AU) by potom šlo vyložit tak, že sestřižená mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ* připomíná běžný buněčný transkript více, než nesestřižená pre-mRNA tohoto genu, tudíž je v zahlceném systému i lépe transportována do cytoplasmy. S těmito výsledky ale nebylo možné odhadnout, jaký vliv by mohla mít jaderná degradace RNA na pokusy s plasmidovými konstrukty *AMA1-LacZ* (Obr. 5.4).



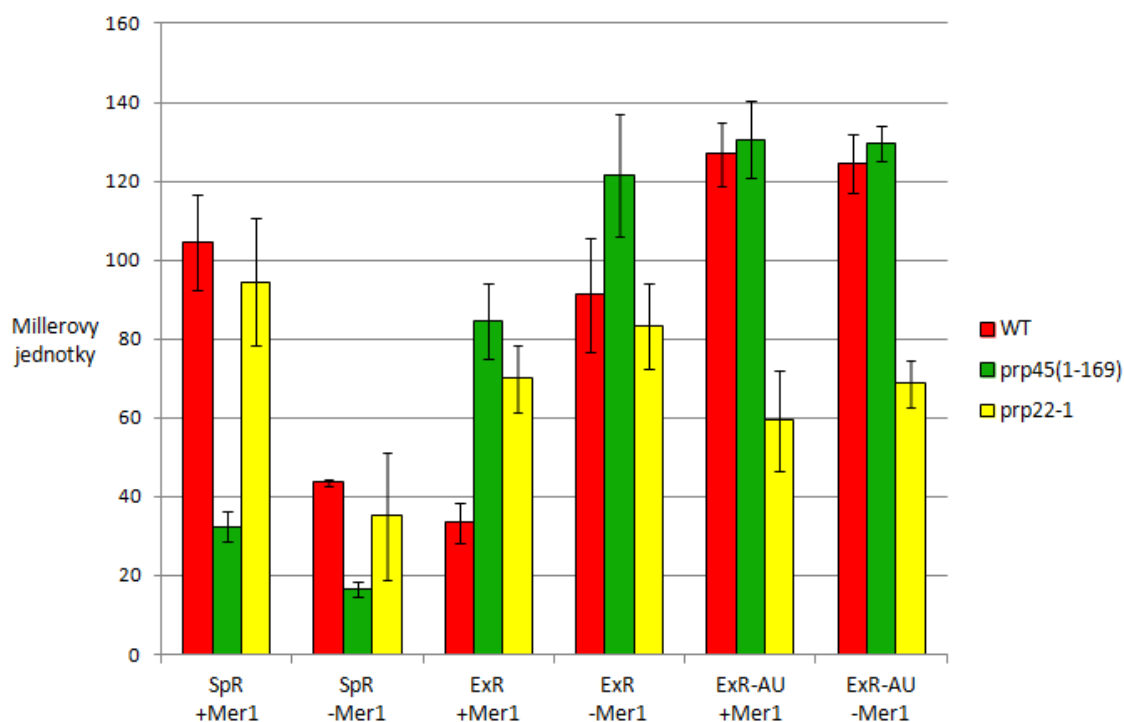
Obr. 5.4: Výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupcového grafu. V grafu jsou uvedeny kmeny WT = BY4741, *prp45(1-169)* = AVY17 a $\Delta rrp6$ = YOR001w. Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér *AMA1-LacZ*, ExR = exportérový reportér *AMA1-LacZ*, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér *AMA1-LacZ*, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Průměrné hodnoty aktivit enzymu β -galaktosidázy v Millerových jednotkách se směrodatnými odchylkami byly vypočteny podle návodu v kapitole 3.2.11. Tento graf představuje část grafu uvedeného na str. 71 (Obr. 4.8 A).

5.2.2 Analýza buněk *prp22-1* s defektem ve druhé sestřihové reakci

Protein Prp22 se účastní druhého kroku sestřihu (Query a Konarska, 2006) a jestli se protein Prp45 neúčastní první transesterifikační reakce, ale pouze druhé transesterifikační reakce, potom by se výsledky s buňkami *prp45*(1-169) měly nejvíce blížit výsledkům s buňkami *prp22-1*.

U buněk *prp22-1* se v souvislosti s defektem ve druhém kroku sestřihu očekávalo snížení β -galaktosidázové aktivity jak v případě sestřihového reportéru (SpR), tak v případě exportérového reportéru (ExR). U prvního z reportérů je totiž enzym β -galaktosidázova přepisován z funkční mRNA genu *AMAI-LacZ*, pro jejíž vznik je nutné, aby proběhl první i druhý krok sestřihu. U druhého z reportérů je pro vznik β -galaktosidázy nutná nepoškozená pre-mRNA, tudíž nesmí proběhnout ani jeden krok sestřihu. Chyba v první transesterifikační reakci by tedy měla zvýšit β -galaktosidázovou aktivitu u buněk s exportérovým reportérem (ExR), zatímco chyba ve druhé transesterifikační reakci by aktivitu ovlivnit neměla.

V tomto případě se však teoretické předpoklady nenaplnily. β -galaktosidázová aktivita buněk *prp22-1* se sestřihovým reportérem (SpR) se skoro nelišila od aktivity WT buněk jak v přítomnosti proteinu Mer1, tak v jeho nepřítomnosti. Také β -galaktosidázová aktivita buněk s exportérovým reportérem v nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR -Mer1) se podobala situaci u WT buněk. Aktivita buněk s exportérovým reportérem za přítomnosti proteinu Mer1 (ExR +Mer1) však převyšovala aktivitu WT buněk a jako jediná se hodně přibližovala aktivitě buněk *prp45*(1-169) se stejným typem reportéru. Oproti tomu mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) měl poměrně nízkou aktivitu. Nižší aktivitu v rámci buněk *prp22-1* vykazoval jedině sestřihový reportér za nepřítomnosti proteinu Mer1 (SpR -Mer1). Dalo by se však říci, že hladiny β -galaktosidázové aktivity u exportérového reportéru (ExR) i u mutovaného exportérového reportéru (ExR-AU) dosahovaly u buněk *prp22-1* přibližně stejných hodnot bez ohledu na protein Mer1 (Obr. 5.5).



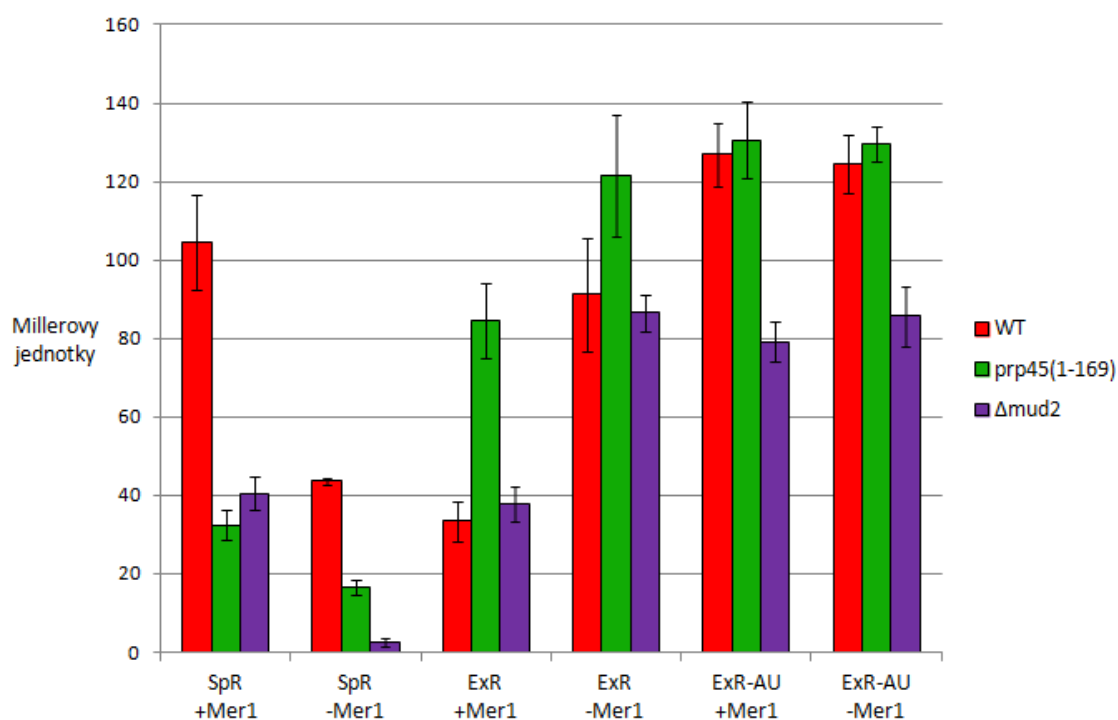
Obr. 5.5: Výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupcového grafu. V grafu jsou uvedeny kmeny WT = BY4741, *prp45*(1-169) = AVY17 a *prp22-1* = KGY2847. Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Průměrné hodnoty aktivit enzymu β -galaktosidázy v Millerových jednotkách se směrodatnými odchylkami byly vypočteny podle návodu v kapitole 3.2.11. Tento graf představuje část grafu uvedeného na str. 71 (Obr. 4.8 A).

Výsledky dosažené s použitím tohoto buněčného kmene se tedy příliš neshodovaly s výsledky dosaženými s použitím buněk *prp45*(1-169), a rozcházely se i s předběžným očekáváním. Je možné, že pokusy s buňkami *prp22-1* byly ovlivněny jejich špatnou vitalitou. Kmen Y04923 totiž velmi pomalu rostl i za optimálních podmínek a přítomnost dvou plasmidů měla za následek další snížení životaschopnosti. Pozorování těchto buněk pod mikroskopem také ukázalo větší množství mrtvých buněk než u ostatních použitých kmenů *S. cerevisiae* (Obr. 4.7). Při dalších experimentech tohoto typu by určitě bylo vhodné použít buněčný kmen s jinou mutací poškozující druhou transesterifikační reakci a porovnat výsledky s hodnotami β -galaktosidázové aktivity dosaženými při těchto pokusech na buňkách *prp22-1*.

5.2.3 Analýza buněk *Δmud2* s defektem v první sestřihové reakci

Protein Mud2 se účastní prvního kroku sestřihu pre-mRNA (Rain a Legrain, 1997) a pokud se protein Prp45 tohoto kroku účastní také, pak by výsledky pokusů s kmeny AVY17 (*prp45*(1-169)) a Y04923 (*Δmud2*) měly vykazovat jistou podobnost.

V souladu s tímto předpokladem měly buňky *Δmud2* se sestřihovým reportérem (SpR) sníženou aktivitu β -galaktosidázy ve srovnání s WT buňkami, obdobně jako buňky *prp45*(1-169). Oproti tomu buňky s exportérovým reportérem (ExR) neměly zvýšenou aktivitu β -galaktosidázy ve srovnání s WT buňkami, čímž se buňky *Δmud2* podobaly spíše kmeni BY4741 (WT). Ovšem při pohledu na hodnoty mutovaných exportérových reportérů (ExR-AU) bylo vidět, že buňky *Δmud2* měly nižší aktivitu než WT buňky i než buňky *prp45*(1-169). A exportérový reportér za nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR -Mer1) měl u buněk *Δmud2* stejnou aktivitu jako mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) u téhož typu buněk, což zase připomínalo situaci buněk *prp45*(1-169) (Obr. 5.6).



Obr. 5.6: Výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupcového grafu. V grafu jsou uvedeny kmeny WT = BY4741, *prp45(1-169)* = AVY17 a Δ *mud2* = Y04923. Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Průměrné hodnoty aktivit enzymu β -galaktosidázy v Millerových jednotkách se směrodatnými odchylkami byly vypočteny podle návodu v kapitole 3.2.11. Tento graf představuje část grafu uvedeného na str. 71 (Obr. 4.8 A).

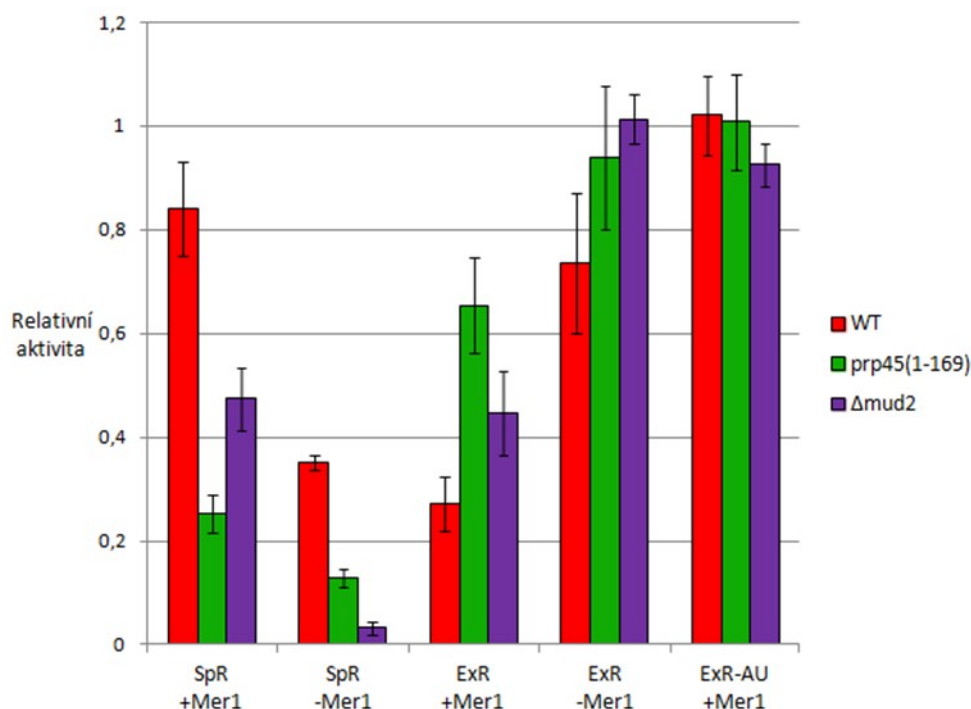
Při bližším pohledu bylo nutné vzít v potaz možnost, že buňky Δ *mud2* mohly mít pouze sníženou β -galaktosidázovou aktivitu u všech reportérů oproti buňkám *prp45(1-169)*, ale celkový profil obou kmenů mohl být jinak shodný. Z tohoto důvodu byla provedena normalizace původního grafu (Obr. 4.8 A) na hodnoty mutovaného exportérového reportéru za nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR-AU -Mer1; Obr. 4.8 B).

Podobnost buněk *prp45(1-169)* a Δ *mud2* byla v normalizovaném grafu už vyšší. V případě sestřihového reportéru (SpR) měly oba kmeny nižší β -galaktosidázovou aktivitu ve srovnání s WT buňkami a v případě exportérového reportéru (ExR) měly zase vyšší aktivitu ve srovnání s těmito buňkami. Stále však byly patrné rozdíly. Vypadalo to, že pokud se protein Prp45 skutečně podílí na prvním kroku sestřihu pre-mRNA genu *AMA1*, podobně jako protein Mud2, potom Mud2 vykazuje větší

funkční spojitost s proteinem Mer1. Jestliže byl totiž Mer1 přítomen, pak buňky *Δmud2* sestřihovaly pre-mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ* lépe než buňky *prp45(1-169)*, což se projevilo zvýšením jejich β -galaktosidázové aktivity u sestřihového reportéru (SpR +Mer1) a snížením jejich aktivity u exportérového reportéru (ExR +Mer1) oproti buňkám *prp45(1-169)*. Za nepřítomnosti proteinu Mer1 potom buňky *Δmud2* sestřihovaly intron genu *AMA1* u sestřihového reportéru (SpR -Mer1) hůře než buňky *prp45(1-169)*, což se projevilo snížením β -galaktosidázové aktivity oproti buňkám *prp45(1-169)* (Obr. 5.7).

U buněk *Δmud2* s exportérovým reportérem za nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR -Mer1) však zhoršení sestřihu již patrné nebylo. To mohlo být způsobeno tím, že buňky *prp45(1-169)* nesoucí tento reportér (ExR -Mer1) neseestřihovaly téměř žádnou pre-mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ*, tudíž u buněk *Δmud2* nebylo možné pozorovat už žádné další zhoršení sestřihu. Výše zmíněný předpoklad vycházel z faktu, že mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) by neměl být sestřihován (bez ohledu na přítomnost proteinu Mer1) a tudíž by jeho β -galaktosidázová aktivita měla odrážet maximální míru exportu pre-mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ* z jádra do cytoplasmy. Pokud tedy exportérový reportér za nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR -Mer1) vykazoval stejnou β -galaktosidázovou aktivitu jako mutovaný exportérový reportér (ExR-AU), potom by teoreticky neměl být sestřihován ani jeden z nich (Obr. 5.7).

Z výsledků β -galaktosidázové analýzy vynesných do normalizovaného sloupcového grafu (Obr. 5.7) bylo tedy zřejmé, že buňky *Δmud2* se svým chováním z hlediska exprese plasmidových konstruktů *AMA1-LacZ* do značné míry podobaly buňkám *prp45(1-169)*. Existovaly mezi nimi však jisté rozdíly (např. různá maximální hladina exprese fúzního genu *AMA1-LacZ* nebo odlišná míra odpovědi na přítomnost či nepřítomnost proteinu Mer1), díky nimž nebylo možné s jistotou říci, zda se v případě pre-mRNA genu *AMA1* protein Prp45 skutečně podílí na prvním kroku sestřihové reakce. I tak se ale jedná o další indicii ukazující na možnou úlohu proteinu Prp45 v první transesterifikační reakci.



Obr. 5.7: Výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy u buněk *S. cerevisiae* vynesené do sloupcového grafu a normalizované na hodnotu ExR-AU -Mer1. V grafu jsou uvedeny kmeny WT = BY4741, *prp45*(1-169) = AVY17 a Δ *mud2* = Y04923. Každý typ buněk obsahoval dva z těchto plasmidů: SpR = sestříhový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportérový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportérový reportér AMA1-LacZ, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. Tento graf představuje část grafu uvedeného na str. 71 (Obr. 4.8 B).

5.3 Analýza RNA fúzního genu *AMA1-LacZ*

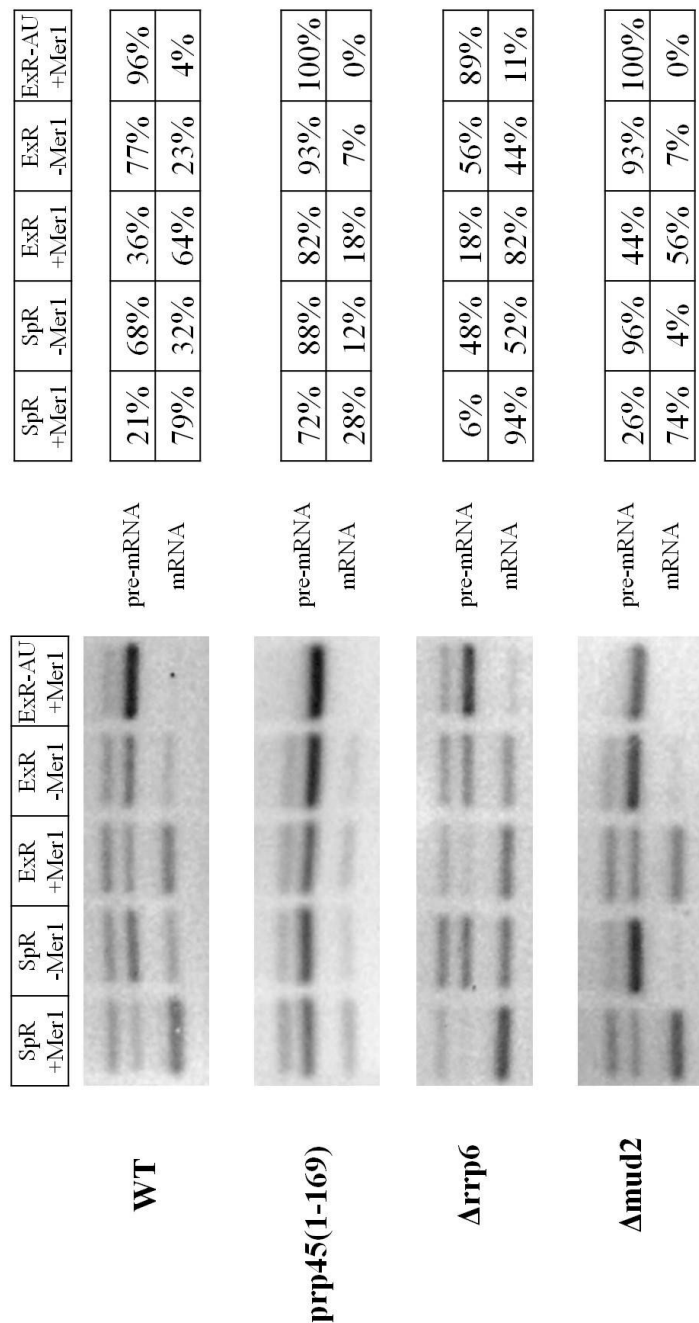
Analýza RNA měla za úkol dalším způsobem podpořit výsledky analýzy aktivity enzymu β -galaktosidázy. Na rozdíl od předchozího pokusu zde bylo možné sledovat pouze poměr pre-mRNA a mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ*. Absolutní hladina RNA, sestříhové intermediáty, export RNA z jádra do cytoplasmy ani přepis RNA do proteinů zde už nehrály roli.

Tento pokus byl sice proveden pouze jednou (Obr. 4.9), ale mimo něj byl v naší laboratoři za jiným účelem proveden ještě jeden obdobný pokus, který bylo možné chápat jako jeho opakování (Ondřej Gahura, nepublikované výsledky). Tentokrát ale nebyly použity buňky *prp22-1* a nebyl využit mutovaný exportérový reportér za nepřítomnosti proteinu Mer1 (ExR-AU -Mer1; Obr. 5.8), který se v předešlých

pokusech choval stejně jako mutovaný exportérový reportér za přítomnosti proteinu Mer1 (ExR-AU +Mer1).

Tato analýza mimo jiné ukázala, že nejlépe je pre-mRNA fúzního genu *AMAI-LacZ* sestřihována u buněk *Arrp6*, což je v souladu s našimi původními předpoklady (kapitola 5.2.1). Buňky tohoto kmene sestřihovaly pre-mRNA lépe než WT buňky jak v přítomnosti proteinu Mer1, tak v jeho nepřítomnosti. Zajímavé bylo také zjištění, že k sestřihu ve velmi malé míře docházelo i v případě mutovaného exportérového reportéru za účasti proteinu Mer1 (ExR-AU +Mer1). Dlouhý pobyt pre-mRNA v jádře za přítomnosti tohoto sestřih podporujícího proteinu vedl pravděpodobně k tomu, že malá část transkriptů byla sestřižena, i když měla defektní 5'ss (Obr. 4.9). V případě nepublikovaných výsledků Ondřeje Gahury bylo vidět, že tento konstrukt dokázaly sestřihovat za přítomnosti proteinu Mer1 dokonce i WT buňky (Obr. 5.8).

Z výsledků získaných na sestřihovém reportéru (SpR) a exportérovém reportéru (ExR) bylo dále patrné, že sestřih byl nejvíce poškozen u buněk *prp45(1-169)*, které sestřihovaly pouze relativně malou část pre-mRNA i za přítomnosti proteinu Mer1. Obdobně nízká míra sestřihu byla pozorována i u buněk *Amud2* za nepřítomnosti proteinu Mer1. Procento mRNA u tohoto kmene za přítomnosti proteinu Mer1 ale připomínalo spíše WT buňky. Zhoršený sestřih za přítomnosti i nepřítomnosti proteinu Mer1 byl pozorován i u buněk *prp22-1*. Za přítomnosti proteinu Mer1 ale žádný kmen nedosáhl tak nízkého podílu sestřižené mRNA jako AVY17 (*prp45(1-169)*; Obr. 4.9). Pokud se však protein Prp45 skutečně podílí nejen na druhé, ale i na první transesterifikační reakci, potom jeho mutace zasáhla oba kroky sestřihu, a tento kombinovaný defekt mohl způsobit razantní pokles mRNA u kmene AVY17 i za přítomnosti proteinu Mer1.



Obr. 5.8: Výsledky analýzy RNA u buněk *S. cerevisiae* s konstrukty AMA1-LacZ. Použity byly kmeny WT = BY4741, *prp45(1-169)* = AVY17, *Arrp6* = YOR001w a *Amud2* = Y04923. Každý typ buněk nesl dva z těchto plasmidů: SpR = sestřihový reportér AMA1-LacZ, ExR = exportový reportér AMA1-LacZ, ExR-AU = mutovaný exportový reportér *AMA1-LacZ*, +Mer1 = plasmid R1070, -Mer1 = plasmid R1130. PCR produkty byly elektroforeticky analyzovány v 1% agarózovém gelu (vlevo) za použití pufru 1x TAE při napětí 1 V/cm. Jejich snímky byly upraveny programem Adobe Photoshop a následně kvantifikovány programem ImageQuant TL (vpravo). Prostřední proužek v gelu je nesestřižená pre-mRNA fúzního genu *AMA1-LacZ*, spodní proužek je sestřižená mRNA fúzního genu AMA1-LacZ a vrchní proužek je pravděpodobně mRNA párující s pre-mRNA. V tabulce je potom uveden poměr mezi sestřiženou mRNA a nesestřiženou pre-mRNA (Ondřej Gahura, nepublikované výsledky).

6 Závěr

Účelem této práce bylo analyzovat vliv kvasinkového proteinu Prp45 (homolog lidské proteinu SNW1/SKIP) na sestřih pre-mRNA a na export RNA z jádra do cytoplasmy pomocí sady plasmidových konstruktů AMA1-CUP1 a AMA1-LacZ.

Většina použitých konstruktů byla darem od laboratoře Marca Spingoly, mutovaný exportérový reportér (ExR-AU) AMA1-LacZ byl připraven v rámci projektu. V jeho rámci byla zavedena i příprava buněčných extraktů pro měření a analýzu aktivity β -galaktosidázy.

Tato práce přinesla poznatky podporující možný vliv proteinu Prp45 na průběh první transesterifikační reakce sestřihu pre-mRNA. V publikované literatuře byla zatím prokázána účast proteinu Prp45 na druhé transesterifikační reakci. Existuje však také několik informací naznačujících zapojení tohoto proteinu do první reakce.

Chování reportérových plasmidů při pokusech s buňkami nesoucími mutovanou alelu *prp45*(1-169) ve srovnání s buňkami nesoucími přirozenou alelu *PRP45* naznačovalo sestřihové defekty, které by teoreticky mohly odpovídat poškození první transesterifikační reakce. Srovnání těchto buněk však nepřineslo žádné důkazy podporující účast proteinu Prp45 na exportu RNA z jádra do cytoplasmy.

Buňky *prp45*(1-169) se v některých ohledech chovaly během pokusů podobně jako buňky *Δ mud2*, které mají poškozenou právě první sestřihovou reakci. Některé jejich odlišnosti by bylo možné vysvětlit tím, že buňky *prp45*(1-169) mají mimo první transesterifikační reakce poškozenou i druhou transesterifikační reakci. Žádné pádné důkazy podporující zapojení proteinu Prp45 do první reakce sestřihu se ale získat nepodařilo.

Chování buněk *prp22-1*, které měly poškozenou druhou transesterifikační reakci sestřihu, bylo možná ovlivněno jejich velmi nízkou viabilitou. Bylo by tedy nejspíše vhodné použít v dalších pokusech jiný typ buněk s mutací postihující druhou reakci sestřihu pro vizualizaci exprese reportérových genů v buňkách s tímto defektem.

Pro ověření případného vlivu jaderné degradační dráhy na expresi reportérových genů byly použity buňky *Δ rrp6*, které mají defekt v jaderném exosomu. Z výsledků se sice nepodařilo určit případný vliv této dráhy na pokus, ale analýza RNA fúzního genu *AMA1-LacZ* ukázala, že za určitých podmínek byly buňky tohoto kmene schopny

sestřihovat i pre-mRNA reportérového konstrukt, který by za normálních okolností sestřihu podléhat neměl.

Seznam bibliografických citací

- Abovich, N., Liao, X.C., a Rosbash, M. (1994). The yeast MUD2 protein: an interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. *Genes & development* 8, 843-854.
- Abovich, N., a Rosbash, M. (1997). Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* 89, 403-412.
- Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C.S., a Beggs, J.D. (2003). Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA* 9, 138-150.
- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., a Lis, J.T. (2002). The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* 420, 837-841.
- Balzer, R.J., a Henry, M.F. (2008). Snu56p is required for Mer1p-activated meiotic splicing. *Molecular and cellular biology* 28, 2497-2508.
- Bellare, P., Small, E.C., Huang, X., Wohlschlegel, J.A., Staley, J.P., a Sontheimer, E.J. (2008). A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nature structural & molecular biology* 15, 444-451.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T., a Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *The Journal of biological chemistry* 273, 13255-13263.
- Burgess, S.M., a Guthrie, C. (1993a). Beat the clock: paradigms for NTPases in the maintenance of biological fidelity. *Trends in biochemical sciences* 18, 381-384.
- Burgess, S.M., a Guthrie, C. (1993b). A mechanism to enhance mRNA splicing fidelity: the RNA-dependent ATPase Prp16 governs usage of a discard pathway for aberrant lariat intermediates. *Cell* 73, 1377-1391.
- Burkard, K.T., a Butler, J.S. (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Molecular and cellular biology* 20, 604-616.

- Canavan, R., a Bond, U. (2007). Deletion of the nuclear exosome component RRP6 leads to continued accumulation of the histone mRNA HTB1 in S-phase of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 35, 6268-6279.
- Carpousis, A.J. (2002). The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochemical Society transactions* 30, 150-155.
- Coolidge, C.J., Seely, R.J., a Patton, J.G. (1997). Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic acids research* 25, 888-896.
- Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., Geraghty, F., Pereira, H.S., Grosveld, F., a Antoniou, M. (1999). Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *The EMBO journal* 18, 2855-2866.
- Dahl, R., Wani, B., a Hayman, M.J. (1998). The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene* 16, 1579-1586.
- Davis, C.A., Grate, L., Spingola, M., a Ares, M., Jr. (2000). Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic acids research* 28, 1700-1706.
- Dziembowski, A., Ventura, A.P., Rutz, B., Caspary, F., Faux, C., Halgand, F., Laprevote, O., a Séraphin, B. (2004). Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing. *The EMBO journal* 23, 4847-4856.
- Eberle, A.B., Hessle, V., Helbig, R., Dantoft, W., Gimber, N., a Visa, N. (2010). Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PloS one* 5, e11540.
- Engbrecht, J.A., Voelkel-Meiman, K., a Roeder, G.S. (1991). Meiosis-specific RNA splicing in yeast. *Cell* 66, 1257-1268.
- Fabrizio, P., Dannenberg, J., Dube, P., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., a Lührmann, R. (2009). The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Molecular cell* 36, 593-608.

- Figuerola, J.D., a Hayman, M.J. (2004). The human Ski-interacting protein functionally substitutes for the yeast *PRP45* gene. *Biochemical and biophysical research communications* 319, 1105-1109.
- Folk, P., Půta, F., Krpejšová, L., Blahůšková, A., Markoš, A., Rabino, M., a Dottin, R.P. (1996). The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*. *Gene* 181, 229-231.
- Folk, P., Půta, F., a Skružný, M. (2004). Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 629-640.
- Gahura, O., Abrahámová, K., Skružný, M., Valentová, A., Munzarová, V., Folk, P., a Půta, F. (2009). Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *Journal of cellular biochemistry* 106, 139-151.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Gonzalez, C.I., Bhattacharya, A., Wang, W., a Peltz, S.W. (2001). Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 274, 15-25.
- Gottschalk, A., Bartels, C., Neubauer, G., Lührmann, R., a Fabrizio, P. (2001). A novel yeast U2 snRNP protein, Snul7p, is required for the first catalytic step of splicing and for progression of spliceosome assembly. *Molecular and cellular biology* 21, 3037-3046.
- Grainger, R.J., a Beggs, J.D. (2005). Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA* 11, 533-557.
- Herrero, E. (2005). Evolutionary relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and other fungal species as determined from genome comparisons. *Revista iberoamericana de micologia* 22, 217-222.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., a Jensen, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538-542.

- Jacquier, A. (1990). Self-splicing group II and nuclear pre-mRNA introns: how similar are they? *Trends in biochemical sciences* *15*, 351-354.
- Jensen, T.H., Dower, K., Libri, D., a Rosbash, M. (2003). Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Molecular cell* *11*, 1129-1138.
- Juneau, K., Nislow, C., a Davis, R.W. (2009). Alternative splicing of *PTC7* in *Saccharomyces cerevisiae* determines protein localization. *Genetics* *183*, 185-194.
- Juneau, K., Palm, C., Miranda, M., a Davis, R.W. (2007). High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 1522-1527.
- Kistler, A.L., a Guthrie, C. (2001). Deletion of *MUD2*, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for Sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes & development* *15*, 42-49.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., a Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* *121*, 713-724.
- Leong, G.M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J.L., Hayman, M.J., Eisman, J.A., a Kouzmenko, A.P. (2001). Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry* *276*, 18243-18248.
- Li, B., Vilardeell, J., a Warner, J.R. (1996). An RNA structure involved in feedback regulation of splicing and of translation is critical for biological fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 1596-1600.
- Lorentzen, E., Walter, P., Fribourg, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Klug, G., a Conti, E. (2005). The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nature structural & molecular biology* *12*, 575-581.
- Luz, J.S., Tavares, J.R., Gonzales, F.A., Santos, M.C., a Oliveira, C.C. (2007). Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie* *89*, 686-691.

- Mathew, R., Hartmuth, K., Mohlmann, S., Urlaub, H., Ficner, R., a Lührmann, R. (2008). Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nature structural & molecular biology* 15, 435-443.
- Mesa, A., Somarelli, J.A., a Herrera, R.J. (2008). Spliceosomal immunophilins. *FEBS letters* 582, 2345-2351.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., a Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457-466.
- Munding, E.M., Igel, A.H., Shiue, L., Dorigi, K.M., Trevino, L.R., a Ares, M., Jr. (2010). Integration of a splicing regulatory network within the meiotic gene expression program of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 24, 2693-2704.
- Nakagawa, T., a Ogawa, H. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* *MER3* gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis. *The EMBO journal* 18, 5714-5723.
- Nandabalan, K., a Roeder, G.S. (1995). Binding of a cell-type-specific RNA splicing factor to its target regulatory sequence. *Molecular and cellular biology* 15, 1953-1960.
- Nash, R., Weng, S., Hitz, B., Balakrishnan, R., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., *et al.* (2007). Expanded protein information at SGD: new pages and proteome browser. *Nucleic acids research* 35, D468-471.
- Nilsen, T.W. (1994). RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell* 78, 1-4.
- Nilsen, T.W., a Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457-463.
- Ohi, M.D., a Gould, K.L. (2002). Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA* 8, 798-815.

- Parenteau, J., Durand, M., Veronneau, S., Lacombe, A.A., Morin, G., Guerin, V., Cecez, B., Gervais-Bird, J., Koh, C.S., Brunelle, D., *et al.* (2008). Deletion of many yeast introns reveals a minority of genes that require splicing for function. *Molecular biology of the cell* *19*, 1932-1941.
- Parker, R., Siliciano, P.G., a Guthrie, C. (1987). Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell* *49*, 229-239.
- Patel, A.A., a Steitz, J.A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature reviews. Molecular cell biology* *4*, 960-970.
- Prathapam, T., Kuhne, C., a Banks, L. (2002). Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic acids research* *30*, 5261-5268.
- Preker, P.J., Kim, K.S., a Guthrie, C. (2002). Expression of the essential mRNA export factor Yralp is autoregulated by a splicing-dependent mechanism. *RNA* *8*, 969-980.
- Qiu, Z.R., Schwer, B., a Shuman, S. (2011). Determinants of Nam8-dependent splicing of meiotic pre-mRNAs. *Nucleic acids research* *39*, 3427-3445.
- Query, C.C., a Konarska, M.M. (2006). Splicing fidelity revisited. *Nature structural & molecular biology* *13*, 472-474.
- Rain, J.C., a Legrain, P. (1997). In vivo commitment to splicing in yeast involves the nucleotide upstream from the branch site conserved sequence and the Mud2 protein. *The EMBO journal* *16*, 1759-1771.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., a Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome research* *12*, 1231-1245.
- Ruskin, B., Zamore, P.D., a Green, M.R. (1988). A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* *52*, 207-219.
- Rutz, B., a Séraphin, B. (1999). Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA* *5*, 819-831.

- Selenko, P., Gregorovic, G., Sprangers, R., Stier, G., Rhani, Z., Kramer, A., a Sattler, M. (2003). Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP. *Molecular cell* 11, 965-976.
- Scherrer, F.W., Jr., a Spingola, M. (2006). A subset of Mer1p-dependent introns requires Bud13p for splicing activation and nuclear retention. *RNA* 12, 1361-1372.
- Schilders, G., Raijmakers, R., Raats, J.M., a Pruijn, G.J. (2005). MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nucleic acids research* 33, 6795-6804.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., a Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic acids research* 37, 1127-1140.
- Schwer, B. (2008). A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. *Molecular cell* 30, 743-754.
- Small, E.C., Leggett, S.R., Winans, A.A., a Staley, J.P. (2006). The EF-G-like GTPase Snu114p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DExD/H box ATPase. *Molecular cell* 23, 389-399.
- Smith, D.J., a Konarska, M.M. (2008). Mechanistic insights from reversible splicing catalysis. *RNA* 14, 1975-1978.
- Sperling, J., Azubel, M., a Sperling, R. (2008). Structure and function of the Pre-mRNA splicing machine. *Structure* 16, 1605-1615.
- Spingola, M., a Ares, M., Jr. (2000). A yeast intronic splicing enhancer and Nam8p are required for Mer1p-activated splicing. *Molecular cell* 6, 329-338.
- Spingola, M., Armisen, J., a Ares, M., Jr. (2004). Mer1p is a modular splicing factor whose function depends on the conserved U2 snRNP protein Snu17p. *Nucleic acids research* 32, 1242-1250.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., a Ares, M., Jr. (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 5, 221-234.

- Staley, J.P., a Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Synowsky, S.A., van Wijk, M., Rajmakers, R., a Heck, A.J. (2009). Comparative multiplexed mass spectrometric analyses of endogenously expressed yeast nuclear and cytoplasmic exosomes. *Journal of molecular biology* 385, 1300-1313.
- Tseng, C.K., a Cheng, S.C. (2008). Both catalytic steps of nuclear pre-mRNA splicing are reversible. *Science* 320, 1782-1784.
- Valcarcel, J., Gaur, R.K., Singh, R., a Green, M.R. (1996). Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science* 273, 1706-1709.
- van Hoof, A., Lennertz, P., a Parker, R. (2000). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Molecular and cellular biology* 20, 441-452.
- Vinciguerra, P., Iglesias, N., Camblong, J., Zenklusen, D., a Stutz, F. (2005). Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *The EMBO journal* 24, 813-823.
- Wahl, M.C., Will, C.L., a Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.
- Wang, Q., Zhang, L., Lynn, B., a Rymond, B.C. (2008). A BBP-Mud2p heterodimer mediates branchpoint recognition and influences splicing substrate abundance in budding yeast. *Nucleic acids research* 36, 2787-2798.
- Will, C.L., a Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
- Xu, Y.Z., a Query, C.C. (2007). Competition between the ATPase Prp5 and branch region-U2 snRNA pairing modulates the fidelity of spliceosome assembly. *Molecular cell* 28, 838-849.
- Zhang, C., Baudino, T.A., Dowd, D.R., Tokumaru, H., Wang, W., a MacDonald, P.N. (2001). Ternary complexes and cooperative interplay between NCoA-62/Ski-interacting protein and steroid receptor coactivators in vitamin D

- receptor-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* 276, 40614-40620.
- Zhang, C., Dowd, D.R., Staal, A., Gu, C., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., a MacDonald, P.N. (2003). Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *The Journal of biological chemistry* 278, 35325-35336.
- Zhang, D., a Rosbash, M. (1999). Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex. *Genes & development* 13, 581-592.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., a Hayward, S.D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Molecular and cellular biology* 20, 2400-2410.
- Zuo, P., a Maniatis, T. (1996). The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes & development* 10, 1356-1368.